

CHARAKTERISIERUNG $G\alpha_{i3}$ -GENDEFIZIENTER MAUSLINIEN

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät Chemie und Pharmazie
der Universität Regensburg.



vorgelegt von

Karinna Marie Thiele geb. Klement

aus Freiburg im Breisgau

im Jahr 2014

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von März 2005 bis Dezember 2008 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Als externer Promovend an der Universität Regensburg wurde die Arbeit von Prof. Dr. Armin Buschauer angeleitet.

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am 19. Februar 2014.
Tag der mündlichen Prüfung: 25.04.2014

Prüfungsausschuss:	Prof. Dr. Jörg Heilmann	(Vorsitzender)
	Prof. Dr. Armin Buschauer	(1. Gutacher)
	Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg	(2. Gutachter)
	Prof. Dr. Joachim Wegener	(Drittprüfer)

Wer die Weisheit sucht, ist ein weiser Mann;
wer glaubt, sie gefunden zu haben, ist ein Narr.

Seneca

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGEN	1
1 EINLEITUNG	1
1.1 Allgemeine Prinzipien der zellulären Signalweiterleitung	1
1.2 G-Protein vermittelte Signaltransduktion	5
1.2.1 Aufbau und Funktion von G-Proteinen	5
1.2.2 G-Proteine und ihre Rolle im Energiestoffwechsel	20
1.2.3 $G\alpha_i$ -Proteine und ihre biologischen Funktionen	23
1.3 Autophagie	27
1.3.1 Prinzip und Mechanismus der Autophagie	27
1.3.2 Physiologische und pathologische Bedeutung der Autophagie	29
1.3.3 Verschiedene Arten der Autophagie	30
1.3.4 Molekulare Regulation der Autophagie	32
1.3.4.1 Molekulare Komponenten in der Autophagosomenbildung	32
1.3.4.2 Das Atg12-Atg5-Konjugationssystem	33
1.3.4.3 Das LC3-Konjugationssystem	33
1.3.4.4 Die Insulin- und Aminosäurevermittelte Regulation der Autophagie	34
2 FRAGESTELLUNG	37
3 MATERIAL UND METHODEN	38
3.1 Material	38
3.1.1 Geräte	38
3.1.2 Hersteller und Lieferanten	39
3.1.3 Chemikalien	40
3.1.4 Enzyme, Proteine, Peptide und andere biologisch aktive Substanzen	42
3.1.5 Antikörper	43
3.1.6 Bakterien und Zellen	44
3.1.7 Zellkulturmedien und Zusätze	45

3.1.8	Expressionsvektoren und Plasmide	45
3.1.9	Reagenzien für die Molekularbiologie	45
3.1.10	Sonstige Gebrauchsartikel	45
3.2	Methoden	46
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	46
3.2.1.1	Transformation von Escherichia coli mit DNA	46
3.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA	46
3.2.2	Zellbiologische Methoden	47
3.2.2.1	Transiente Transfektion	47
3.2.2.2	Allgemeine Zellkultur	47
3.2.2.3	Isolierung von embryonalen Mausfibroblasten	48
3.2.2.4	Kryokonservierung eukaryotischer Zellen	48
3.2.2.5	Auftauen kryokonservierter eukaryotischer Zellen	49
3.2.2.6	Isolierung und Kultivierung von Maushepatozyten	49
3.2.2.7	Immunofluoreszenz	53
3.2.2.8	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	54
3.2.3	Biochemische Methoden	55
3.2.3.1	Herstellung von Zell-Lysaten	55
3.2.3.2	Proteinbestimmung	55
3.2.3.3	Generierung $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -spezifischer Antikörper	56
3.2.3.4	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	58
3.2.3.5	Isolierung von Autophagosomen	62
3.2.4	Tierexperimentelle Methoden	63
3.2.4.1	Konditionstest	63
3.2.4.2	Langzeitbeobachtung von Wildtyp-Mäusen vs. $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen	64
4	ERGEBNISSE	67
4.1	Funktion von $G\alpha_i$ -Proteinen in der Autophagie	67
4.1.1	Die murine Hepatozytenkultur	67
4.1.1.1	Auswirkung von Perfusionsparametern auf die Viabilität der Hepatozyten	68
4.1.2	Etablierung Isoform-spezifischer Antikörper gegen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$	70
4.1.3	Validierung eines LC3-Antikörpers für Immunzytochemie	74
4.1.4	Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von $G\alpha_{i3}$	78
4.1.5	Die Bildung von LC3-positiven Vesikeln ist $G\alpha_{i3}$ -abhängig	81
4.1.6	Biochemischer Nachweis von $G\alpha_{i3}$ in autophagosomalen Membranen	83
4.1.7	Funktion von $G\alpha_{i3}$ in mTOR-medierten Signalwegen	85
4.2	Charakterisierung von $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen	88
4.2.1	Genotypische Verteilung von Mäusen aus $G\alpha_{i2}^{(+/-)}/G\alpha_{i3}^{(+/-)}$ -Kreuzungen	88

4.2.2	Konditionstest	91
4.2.3	Langzeitbeobachtung von $G\alpha_{i3}$ -defizienten versus Wildtyp-Mäusen	92
4.2.3.1	Übersicht über die Gewichtsentwicklung von Wildtyp- und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen	93
4.2.3.2	Analyse des Fettgewebes bei $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen	94
4.2.3.3	Fellveränderungen der $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse	95
4.2.3.4	Kaplan-Meier Überlebensanalyse	97
4.2.3.5	Auswertung von klinisch-chemischen Parametern der Serumanalyse	100
5	DISKUSSION	102
5.1	Funktionelle Substitution der G_i -Proteine $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ füreinander	102
5.2	Die Beteiligung von $G\alpha_{i3}$ bei der Insulin- und Aminosäure-vermittelten hepatischen autophagischen Proteolyse	103
5.2.1	$G\alpha_{i3}$ kolokalisiert mit LC3 auf Autophagosomen und Endomembranen	104
5.2.2	Funktion von $G\alpha_{i3}$ in mTOR-medierte Signalwegen	112
5.3	Phänotypische Merkmale von $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen	115
5.3.1	Verminderte Aktivität von $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen	116
5.3.2	Vermindertes Körpergewicht und verminderte Fetteinlagerung bei $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen	116
5.3.3	Vorzeitiges Ergrauen des Fells bei $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen	119
5.3.4	Längere Lebensdauer von weiblichen $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen	120
6	ZUSAMMENFASSUNG	122
7	SUMMARY	125
8	LITERATURVERZEICHNIS	128
9	ANHANG	154
9.1	Analyse der Beteiligung von $G\alpha_i$ -Proteinen in der Autophagie mittels In-situ-Leberperfusion	154
9.2	Genotypische Verteilung von Mäusen aus $G\alpha_{i2/i3}$ -Kreuzungen	158
9.3	Gewichtskurven der Einzeltiere aus der Langzeitbeobachtung	159

9.4	Kardiovaskuläre Parameter von $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen	161
9.5	Tabellarische Übersicht der Ergebnisse aus der Serumanalytik	163
10	EIGENE PUBLIKATIONEN	168
11	LEBENS LAUF	170
12	DANKSAGUNG	172

ABKÜRZUNGEN

4E-BP1	<i>eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein 1</i>
AGS	<i>activator of G-protein signaling</i>
AK	Antikörper
ALT	Alanin-Aminotransferase; EC 2.6.1.2
AST	Aspartat-Aminotransferase; EC 2.6.1.1
AP	Alkalische Phosphatase; EC 3.1.3.1
AC	Adenylylzyklase; EC 4.6.1.1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Atg	<i>autophagy-related gene</i>
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
Akt/PKB	Proteinkinase B; EC 2.7.11.1
BES	N,N-Bis-[-2-hydroxyethyl]-2-amino-ethansulfonsäure
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
Cvt	<i>cytoplasm to vacuole targeting</i>
CTX	Choleratoxin, das Enterotoxin des Bakteriums <i>Vibrio cholerae</i>
d	Tage
DAG	Diazylglyzerol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E1-Enzym	Ubiquitin-aktivierendes Enzym; EC 6.3.2.19
E2-Enzym	Ubiquitin-konjugierendes Enzym; EC 6.3.2.19
E64-d	(2S,3S)-trans-Epoxy succinyl-L-leucylamido-3-methylbutan ethylester
EC number	<i>Enzyme Commission number</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N,N'-tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i> , Bakterienzellen

ERK	<i>extracellular signal regulated kinase; EC 2.7.11.24</i>
FCS	fötales Kälberserum
FKBP12	<i>FK506 binding protein of 12 kDa</i>
<i>g</i>	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GAIP	<i>Gα-interacting protein 1</i>
GAP	<i>GTPase-activating protein; EC 3.6.5.1</i>
GDI	<i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GIV	<i>Gα-Interacting vesicle-associated protein</i>
GIRK	<i>G-protein activated inwardly rectifying K⁺ channel</i>
GPA1	<i>G-protein α subunit 1</i>
GβL	<i>G-protein β subunit like protein</i>
Gα	α-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
Gβ	β-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
Gγ	γ-Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins
Gβγ	Dimer aus Gβ und Gγ
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	<i>green fluorescent protein; grün fluoreszierendes Protein der Qualle Aequoria victoria</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor; G-Protein-gekoppelter Rezeptor</i>
GPN	Glycin-Phenyl-β-Naphtylamid
G-Protein	heterotrimeres Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBSS	<i>Hanks buffered salt solution</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IB	Immunoblot
Ig	Immunglobulin
Ins	Inositol
InsP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
kb	Kilobase
kLSM	konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
kDa	Kilodalton

MAP	<i>mitogen-activated protein kinase</i> ; EC 2.7.11.24
(MAP) LC3	<i>(microtubule-associated protein) light chain 3</i>
MEF	Mausembryonalfibroblasten
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK)</i> ; EC 2.7.12.2
min	Minute
mSIN1	<i>mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1</i>
mTOR	<i>mammalian target of rapamycin</i> ; EC 2.7.11.1
N-Terminal	Amino-Terminus
n	Anzahl unabhängiger Experimente
p.c.	<i>post coital</i>
PCD	programmierter Zelltod
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDK-1	<i>phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i> ; EC 2.7.11.1
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration in wässriger Lösung
PH-Domäne	<i>pleckstrin homology domain</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K Klasse I; EC 2.7.1.153, PI3K Klasse III; EC 2.7.1.137)
PKA	Proteinkinase A; EC 2.7.11.11
PKB	Proteinkinase B; EC 2.7.11.1
PKC	Proteinkinase C; EC 2.7.11.13
PLC	Phospholipase C; EC 3.1.4.11
PtdIns	Phosphatidylinositol
PtdIns-3,4-P ₂	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PtdIns-3,4,5-P ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PtdIns-4,5-P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i> ; EC 3.1.3.16; EC 3.1.3.48; EC 3.1.3.67
PTX	Pertussistoxin, Exotoxin von <i>Bordetella pertussis</i>
Q ₅	Quantil (0,5-Quantil)

RGS	<i>regulators of G-protein signaling</i> ; EC 3.6.5.1
Rheb	<i>Ras homolog enriched in brain</i> ; EC 3.6.5.2
Raptor	<i>regulatory associated protein of mTOR</i>
Rictor	<i>rapamycin-insensitive companion of mTOR</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase; EC 2.7.10.1
p70S6K1	<i>p70 ribosomal protein S6 kinase 1</i> ; EC 2.7.11.1
SD	Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
TSC	<i>tuberous sclerosis complex</i>
TEMED	N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol
Tween 20	Polyoxyethylen-(20)-monolaurat
u.a.	unter anderem
ULK1	Serin/Threoni-Proteinkinase; humanes Homolog von Atg1
vgl.	vergleichend
Vps34	<i>vacuolar protein sorting 34</i> (Klasse III PI3-Kinase); EC 2.7.1.137
WD40	Tryptophan(W)-Asparaginsäure(D)40-Domäne
Wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
%	Prozent

Einbuchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren:

A	Alanin	G	Glycin	M	Methionin	S	Serin
C	Cystein	H	Histidin	N	Asparagin	T	Threonin
D	Aspartat	I	Isoleucin	P	Prolin	V	Valin
E	Glutamat	K	Lysin	Q	Glutamin	W	Tryptophan
F	Phenylalanin	L	Leucin	R	Arginin	Y	Tyrosin

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeine Prinzipien der zellulären Signalweiterleitung

Die Wahrnehmung, Verarbeitung und Weiterleitung von Signalen ist eine Voraussetzung für die Funktionalität und die Aufrechterhaltung der Homöostase vielzelliger Organismen. Zellen sind in der Lage, die verschiedensten chemischen oder physikalischen Reize über spezifische Rezeptoren zu detektieren, welche diese Signale über unterschiedliche Mechanismen in das Zellinnere weiterleiten. Für die koordinierte Regulation eines mehrzelligen Organismus müssen die verschiedenen Gewebe, aber auch einzelne Zellen darüber hinaus in der Lage sein, miteinander zu kommunizieren. Dieser Informationsaustausch kann entweder über einen direkten Kontakt z. B. mittels spezieller Adhäsionsmoleküle, durch elektrische Signale oder mit Hilfe löslicher Signalmoleküle hergestellt werden (Ji et al., 1998; Aplin et al., 1998; Lee & Juliano, 2004).

Lösliche Signalmoleküle wirken entweder durch Freisetzung in den interstiellen Raum auf die sezernierende Zelle selbst (autokrin), auf Nachbarzellen (parakrin), oder nach Freisetzung in die Blutbahn auf entfernte Gewebe (endokrin). Sie umfassen Moleküle unterschiedlicher chemischer Struktur, wie Proteine (z. B. das Follikelstimulierende Hormon, FSH), Peptide (z. B. Vasopressin), Aminosäuren (z. B. Glutamat), biogene Amine (z. B. Adrenalin), Fettsäurederivate (z. B. Prostaglandine), Steroide (z. B. Progesteron) oder auch Gase (z. B. Stickstoffmonoxid, NO). Zusätzlich können Zellen externe sensorische Reize, wie Licht, Temperatur oder Druck wahrnehmen oder Geruchs-, Geschmacks- (z. B. Glukose) und Schmerzreize in chemische bzw. elektrische Signale umwandeln (Kroeze et al., 2003).

Lipophile Botenstoffe, wie die Steroid-, Retinoid- oder Thyroidhormone sind dabei in der Lage, durch die Plasmamembran zu diffundieren und an intrazelluläre Rezeptoren zu binden, wodurch sie die Regulation spezifischer Gene beeinflussen (Evans, 1988; Parker, 1993; McKenna & O'Malley, 2001). Im Gegensatz dazu sind hydrophile Signalmoleküle wie z. B. Ionen, Neurotransmitter, Peptidhormone oder Wachstumsfaktoren nicht ohne weiteres in der Lage, ungehindert durch die Plasmamembran zu diffundieren. Derartige Signale können jedoch von an der Plasmamembran lokalisierten Rezeptoren detektiert werden. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor kann dann z. B. durch die Bildung eines sekundären Botenstoffs (*second messenger*) ein intrazelluläres Signal hervorrufen.

Bei dem Großteil der bekannten plasmamembranständigen Rezeptoren handelt es sich um transmembranäre Proteine, welche sowohl eine extrazelluläre Domäne als auch eine intrazelluläre Domäne besitzen und durch Bindung des Liganden an die extrazelluläre Seite des Rezeptors aktiviert werden. Die meisten Zelloberflächen-Rezeptorproteine gehören zu einer von drei Klassen, die durch den Umwandlungsmechanismus definiert werden, den sie nutzen.

Ionenkanal-gekoppelte Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle für die schnelle synaptische Signalübertragung zwischen elektrisch erregbaren Zellen. Diese Rezeptoren sind gleichzeitig Ionenkanäle, deren Permeabilität für bestimmte Ionen durch die Bindung des Liganden moduliert wird (Unwin, 1993). So ist beispielsweise der nikotinische Acetylcholinrezeptor ein Kationenkanal, der durch die Bindung des Neurotransmitters Acetylcholin geöffnet wird (Krauss *et al.*, 2000). Die zelluläre Antwort wird durch das durch den Ionenfluß veränderte Membranpotential ausgelöst (siehe Abbildung 1A).

Enzym-gekoppelte Rezeptoren sind Transmembranproteine, welche die Zellmembran nur einmal durchspannen und im intrazellulären Bereich eine Domäne aufweisen, die selbst eine Enzymaktivität besitzt oder lösliche Enzyme rekrutieren kann (siehe Abbildung 1B). So besitzen Wachstumsfaktor-Rezeptoren eine intrazelluläre Tyrosin-Kinase-Domäne (Schlessinger, 2000). Neben diesen Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) umfasst die Familie der Enzym-gekoppelten Rezeptoren weitere Zelloberflächen-Rezeptoren wie z. B. Rezeptor-Tyrosin-Phosphatasen (Streuli, 1996), Rezeptor-Guanylylzyklasen (Garbers *et al.*, 1994) oder Rezeptor-Serin/Threonin-Kinasen (ten Dijke *et al.*, 1996). Die RTK bilden die größte Gruppe an Wachstumsfaktor-Rezeptoren, zu denen der Insulin-, der *epidermal growth factor* (EGF)- oder der *platelet-derived growth factor* (PDGF)-Rezeptor zu rechnen sind (Songyang & Cantley, 1995). Andere Zelloberflächen-Rezeptoren sind intermolekular mit einem intrazellulären Enzym assoziiert, hierzu sind viele Zytokin-Rezeptoren zu rechnen, die JAK-STAT-Signalwege aktivieren (Taniguchi, 1995).

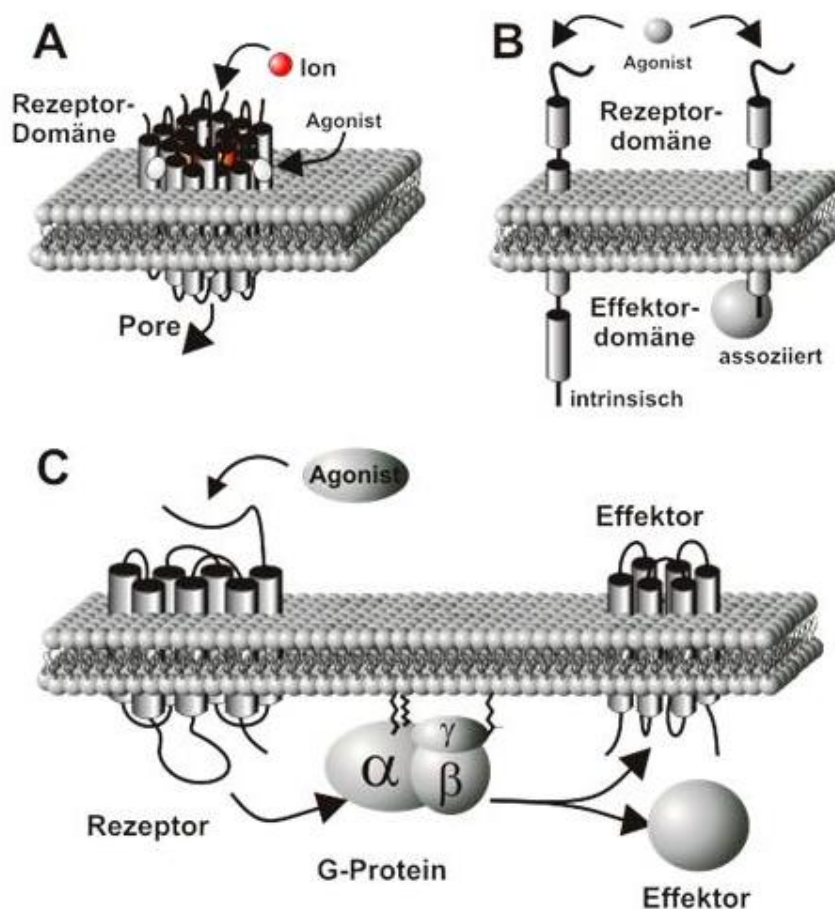


Abbildung 1. Ausgewählte Prinzipien der Signalweiterleitung durch Zelloberflächen-Rezeptoren

Extrazelluläre Signale können auf verschiedene Weise in ein intrazelluläres Ereignis umgewandelt werden. (A) Bei Liganden-gesteuerten Ionenkanälen bilden die extrazelluläre Rezeptordomäne und die Kanalpore, die durch den Liganden gesteuert wird, eine molekulare Einheit. (B) Enzym-gekoppelte Rezeptoren besitzen entweder eine eigene intrazellulär lokalisierte katalytische Domäne oder liegen mit einem Enzym assoziiert vor. (C) G-Protein-gekoppelte Rezeptoren benötigen zur Weiterleitung des Signals an Effektoren ein zusätzliches Schaltermolekül, das sog. G-Protein. Die modulierten Effektoren können ihrerseits membranständig oder zytosolisch lokalisiert sein. Modifiziert nach Udo Maier, Dissertation FU Berlin, Jahr 2000.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen eine dritte wichtige Gruppe an Zelloberflächen-Rezeptoren dar (Pfeuffer & Helmreich, 1988). Während die Ionenkanal- und Enzymgekoppelten Rezeptoren zur Klasse der intramolekularen Rezeptor-Effektor Systeme zugeteilt werden, bei denen eine extrazelluläre Liganden-Bindungsdomäne und eine intrazelluläre Effektordomäne auf *einem* Molekül vereint sind, werden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zur Klasse der intermolekular gekoppelten Rezeptor-Effektor-Systeme gezählt (Birnbaumer *et al.*, 1990, Kaplan, 1981). Hier werden extrazelluläre Signale über ein G-Protein-gekoppeltes, transmembranäres Dreikomponenten-System ins Zellinnere übertragen. Zu den *drei* Systemkomponenten zählt der Rezeptor, der die Zytoplasmamembran siebenfach durch α -helikale Transmembrandomänen durchspannt und der Signalerkennung dient, ein G-

Protein, welches die Amplifikation und die Weiterleitung des Signals ins Zellinnere übernimmt (Transduktion) und schließlich ein Effektor (Abbildung 1C). Die Informationsübermittlung der Komponenten erfolgt dabei nacheinander und reversibel.

Bei sämtlichen der über 1000 bekannten Vertreter der GPCRs, ist die Struktur der heptahelikalen Transmembran-Region ähnlich. Strukturell unterschiedliche Liganden binden an verschiedenen Stellen des jeweiligen GPCRs. Entweder direkt in der Transmembran-Region, an die Transmembran-Helices verbindenden extrazellulären Schleifen oder an die strukturell variablen extrazellulären N-terminalen Bereiche (Bockaert & Pin, 1999). Allein beim Menschen konnten bereits etwa 950 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren identifiziert werden (Takeda *et al.*, 2002). 3 - 4 % des humanen Genoms kodieren für GPCRs, doch trotz der physiologischen Bedeutung dieser Proteinfamilie sind die fundamentalen Mechanismen, mit denen diese Rezeptoren extrazelluläre Signale in das Zellinnere weiterleiten noch nicht vollständig verstanden. Die Mehrheit der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren des Menschen wird den olfaktorischen Rezeptoren zugeordnet. Bei etwa 15 % der humanen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist der endogene Ligand nicht bekannt, diese G-Protein-gekoppelten Rezeptoren werden als verwaiste oder *Orphan-GPCRs* bezeichnet (Chung *et al.*, 2008, Vassilatis *et al.*, 2003).

Der bekannteste und bestuntersuchte Vertreter der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ist das für die Wahrnehmung von Licht verantwortliche Rhodopsin. Bovines Rhodopsin war der erste GPCR, von dem eine durch Röntgenstrukturanalyse gewonnene Struktur vorlag (Palczewski *et al.*, 2000). Aber erst sieben bzw. acht Jahre später erfolgte die Strukturaufklärung der β_2 - bzw. β_1 -Adrenorezeptoren der Arbeitsgruppe um Prof. Brian Kobilka (Rasmussen *et al.*, 2007, Richter *et al.*, 2008, Warne *et al.*, 2008). Dieser Arbeitsgruppe gelang es auch kürzlich erstmals die dreidimensionale Struktur eines GPCRs während der Aktivierung eines G-Proteins zu zeigen (Rasmussen *et al.*, 2011). Im Gegensatz zu Vertretern anderer Rezeptorklassen besitzen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren keine Effektordomäne. Sie aktivieren stattdessen ein trimeres Guaninnukleotid-bindendes Regulatorprotein (G-Protein), das im Sinne eines Signaltransduktors in der Lage ist, die Aktivität von Effektoren zu modulieren (Gudermann *et al.*, 1995, Nürnberg *et al.*, 1995, Wess, 1997). Diese können sowohl membranständig, wie z. B. Ionenkanäle und Adenylylzyklasen (Sunahara *et al.*, 1996), als auch zytosolisch lokalisiert sein, wie z. B. Phospholipase C (PLC) oder Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Isoformen (Hamm, 1998). Die Modulation dieser Effektorproteine bewirkt eine Konzentrationsänderung der von ihnen gebildeten intrazellulären Botenstoffe, die, wie z. B. Ca^{2+} , zyklisches AMP (cAMP) oder Inosi-

toltrisphosphat (IP_3), ins Zytoplasma diffundieren oder, wie z. B. Diacylglycerol (DAG) oder Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat ($PI-3,4,5-P_3$), in der Membran verbleiben.

1.2 G-Protein vermittelte Signaltransduktion

1.2.1 Aufbau und Funktion von G-Proteinen

Zu den am meisten untersuchten Signaltransduktionswegen zählen die Signalwege über Guaninnukleotid-bindende Proteine, den sogenannten G-Proteinen. G-Proteine leiten die Signale von heptahelikalen Rezeptoren an Effektoren im Zellinneren weiter und sind u. a. an der Innenseite der Zytoplasmamembran lokalisiert. An der durch G-Proteine vermittelten Signaltransduktion sind die Grundkomponenten Rezeptor, heterotrimeres G-Protein und Effektor beteiligt.

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus einer α -Untereinheit, die GTP bindet und hydrolysiert, sowie je einer β - und γ -Untereinheit (Gudermann *et al.*, 1996, Hepler & Gilman, 1992, Neer, 1995). Während die $G\alpha$ -Untereinheit als Monomer isoliert werden kann und als solches auch eine funktionelle Aktivität zeigt, wurde der $G\beta\gamma$ -Komplex unter nicht-denaturierenden Bedingungen bisher als nicht dissoziierbar beschrieben (Clapham & Neer, 1997). Der $G\beta\gamma$ -Komplex scheint in der Regel als „funktionelles Monomer“ zu signalisieren.

Die $G\alpha$ -Untereinheit besteht aus zwei Domänen, die als GTPase- und als individuelle, helikale Domäne bezeichnet werden. Die GTPase-Domäne besteht aus drei Switch-Regionen, die als Schleifen ausgebildet sind und eine Nukleotid-Bindetasche formen. Sie vermittelt darüber hinaus die intrinsische GTPase-Aktivität um GTP zu GDP zu spalten, wodurch $G\alpha$ sich selbst und den Signalweg inaktiviert. Bindungen mit dem GPCR, dem $G\beta\gamma$ -Dimer sowie mit Effektoren werden ebenfalls in dieser Domäne strukturell determiniert. Die individuelle Struktur der $G\alpha$ -Untereinheit legt hingegen die helikale Domäne fest, die aus einem Bündel von sechs α -Helices aufgebaut ist. Anhand ihrer Struktur ermöglicht sie den Verschluss der Nukleotid-Bindetasche, wodurch ein gebundenes Nukleotid festgehalten werden kann (Oldham & Hamm, 2008).

Basierend auf der intrinsischen GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit zählen die heterotrimeren G-Proteine zu der Superfamilie der GTPasen. Auf dieser Aktivität beruht auch das regulatorische Prinzip der Signalweiterleitung. In seinem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand liegt das G-Protein heterotrimer vor und ist mit dem Rezeptor (GPCR) assoziiert. Bindet nun ein Ligand an den Rezeptor, kommt es zu einer Konformationsänderung der intrazellulären Domänen. Diese Konformationsänderung

überträgt sich wiederum auf das an ihn gebundene G-Protein ($G\alpha^*GDP\ G\beta\gamma$) und versetzt es in einen aktivierten Zustand, welcher an der $G\alpha$ -Untereinheit die Öffnung der Bindungstasche für Guaninnukleotide und damit die Dissoziation des GDP bewirkt. Die nukleotidfreie $G\alpha$ -Untereinheit kann anschließend GTP binden, das intrazellulär in wesentlich höheren Konzentrationen als GDP vorliegt. Hierdurch ausgelöst durchläuft die $G\alpha$ -Untereinheiten eine erneute Konformationsänderung in den drei als Schalter (switch) I, II und III bezeichneten Regionen. Anschließend dissoziiert das Trimer in seine zwei funktionellen Einheiten, das GTP-gebundene $G\alpha$ -Monomer und ein $G\beta\gamma$ -Dimer. Diese können nun unabhängig voneinander mit Effektoren wechselwirken und diese modulieren (wie z. B. Adenylylcyclasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRKs) und Phospholipasen). Der GPCR wirkt also für ein heterotrimeres G-Protein als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF) indem er die Freisetzung des GDP fördert und den nukleotidfreien Übergangszustand stabilisiert (Oldham & Hamm, 2008).

Die Terminierung der Signalweitergabe erfolgt durch die Hydrolyse des GTP zu GDP durch die GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit. Dadurch schwingt $G\alpha$ in seine ursprüngliche, inaktive Konformation zurück, wodurch die Affinität zu den Effektoren sinkt und die zu $G\beta\gamma$ wieder zunimmt. $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ re-assoziieren und gelangen so erneut in den heterotrimeren Zustand. Nach Bindung an den Rezeptor können nun weitere Zyklen durchlaufen werden (siehe Abbildung 2). Dabei kann ein Agonist besetzter Rezeptor mehrere G-Proteine aktivieren, wodurch es zu einer Signalverstärkung kommt (Nürnberg *et al.*, 1995).

Grundsätzlich kann der GTPase-Zyklus der heterotrimeren G-Proteine durch zwei Familien von Regulatoren moduliert werden: eine Familie stellen die *regulators of G-protein signaling*-Proteine (RGS-Proteine) dar und die andere Familie bilden die *activators of G-Protein-mediated signaling*-Proteine (AGS-Proteine).

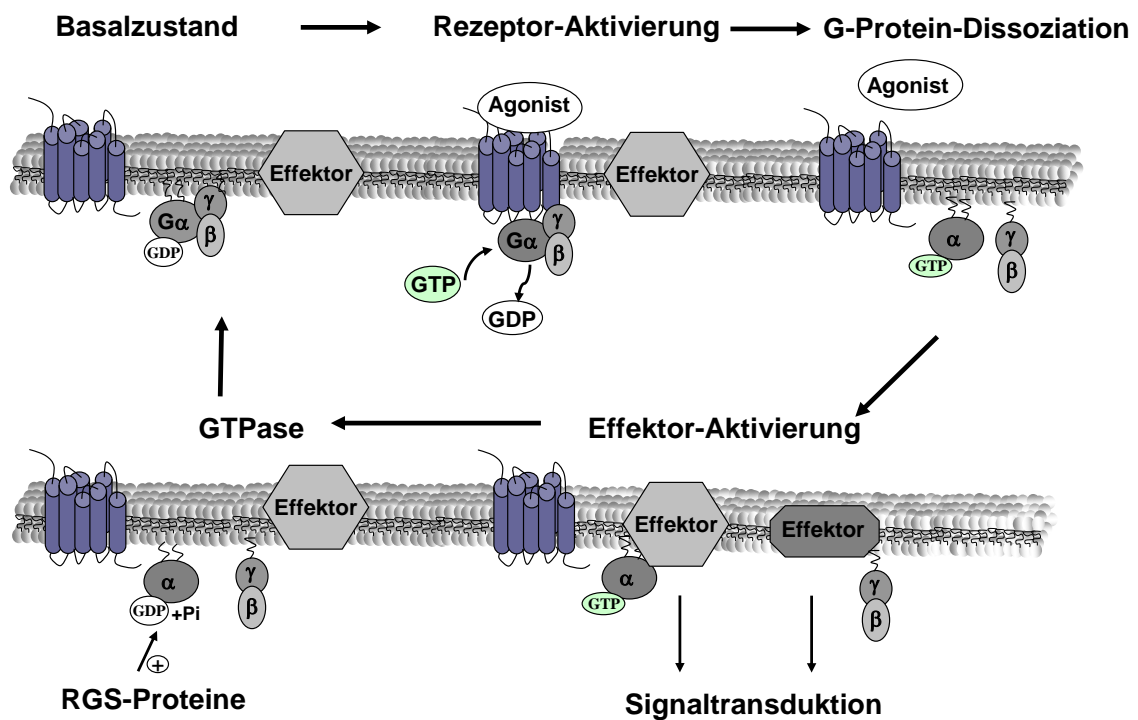


Abbildung 2. Struktur und Aktivierung der heterotrimeren G-Proteine

Agonist-Bindung an einen GPCR-Rezeptor löst die G-Protein Aktivierung aus, wobei die $G\alpha$ -Untereinheit GDP gegen GTP austauscht und es zur Abdissoziation des $\beta\gamma$ -Komplexes kommt. Die intrazelluläre Weiterleitung des Signals erfolgt sowohl durch $G\alpha$ -GTP als auch durch den $\beta\gamma$ -Komplex, welche beide mit Effektormolekülen interagieren können. Weitere Details sind in Abschnitt 1.2.1 erläutert.

RGS-Proteine interagieren mit der GTP-gebundenen α -Untereinheit und erhöhen die intrinsische GTPase-Aktivität 100-fach, wodurch die Signalweiterleitung zu Effektoren beendet wird. Aufgrund dessen werden sie als Regulatoren der G-Proteine bezeichnet und ihre Existenz konnte die Diskrepanz zwischen niedrigen GTPase-Aktivitäten, die bei *in vitro* aufgereinigten $G\alpha$ -Untereinheiten ermittelt werden, und den Messungen einer schnellen Inaktivierung der GPCR-vermittelten Signaltransduktionen *in vivo* aufklären wie z. B. die durch G_i -vermittelte Phototransduktion in den Außensegmenten der Photorezeptorzellen (Arshavsky & Pugh, Jr., 1998, Berman *et al.*, 1996, Siderovski & Willard, 2005, Zerangue & Jan, 1998). RGS-Proteine wirken als GTPase-aktivierende Proteine (GAP) für α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine der Klassen G_i , G_q und $G_{12/13}$. Beim Menschen identifizierten de Vries *et al.* 1995 *G alpha-interacting protein* (GAIP) als erstes RGS-Protein (De Vries L. *et al.*, 1995). Sie zeigten auch als erste eine direkte Interaktion zwischen dem RGS-Protein GAIP und der $G\alpha$ -Untereinheit $G\alpha_{i3}$.

AGS-Proteine wirken wie GPCR, aber unabhängig vom Rezeptor, auf inaktive heterotrimere G-Proteine, indem sie den Nukleotidaustausch der α -Untereinheit beeinflus-

sen (Cismowski *et al.*, 2001). AGS-Proteine werden anhand ihres Wirkmechanismus in drei Gruppen eingeteilt, Gruppe I (AGS1), Gruppe II (AGS3 - 6) und Gruppe III (AGS2, AGS7 und 8). Während der Wirkmechanismus der AGS-Proteine aus der Gruppe I dem Mechanismus eines GPCRs ähnelt in Bezug auf die Fähigkeit als GEF für $G\alpha_i/G\alpha_o$ zu wirken, scheinen die AGS-Proteine der Gruppe II und III die Abdissoziation von GDP zu inhibieren und wirken als Guaninnukleotid-Dissoziations-Inhibitor (GDI). Diese AGS-Proteine (AGS2 bis 8) werden anhand ihrer Bindung an die α -Untereinheit (AGS3 - 6) bzw. $\beta\gamma$ -Untereinheit (AGS2, 7 und 8) gruppiert (Blumer *et al.*, 2005, Blumer *et al.*, 2007).

Das am besten untersuchte Protein aus der AGS-Familie stellt AGS3 dar. In der helikalen Domäne von $G\alpha_i$ wurde eine Bindungsregion für AGS3 gefunden (Natochin *et al.*, 2002). AGS3 weist eine starke Bindung zu GDP- $G\alpha_{i1}$ und GDP- $G\alpha_{i3}$, und eine weniger starke Bindung zu $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_t$ und $G\alpha_o$ auf (Bernard *et al.*, 2001, De Vries L. *et al.*, 2000). AGS3 gehört zu einer neuen Familie von G-Protein-Modulatoren, die im C-Terminus das sogenannte GoLoco-Motiv enthalten. Das GoLoco-Motiv von AGS3 ist ein GDI für $G\alpha_{i1}$ und $G\alpha_{i3}$ (De Vries L. *et al.*, 2000, Kimple *et al.*, 2002, Pattingre *et al.*, 2003). Die Bindung von AGS3 an GDP- $G\alpha$ verhindert dabei die Re-Assoziation von $G\beta\gamma$ an die $G\alpha$ -Untereinheit und „hält“ damit GDP- $G\alpha$ im inaktiven Zustand. Es ist damit der erste beschriebene GDI für ein heterotrimeres G-Protein. AGS-Proteine scheinen die Zellteilung, den Transport von Membranproteinen, die neuronale Entwicklung und die synaptische Plastizität sowie kardiovaskuläre und metabolische Prozesse zu regulieren (Blumer *et al.*, 2007, Blumer *et al.*, 2008, Regner *et al.*, 2011).

$G\alpha$ -Untereinheiten und ihre Effektoren

Die α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine haben ein Molekulargewicht von 39 - 45 kDa (Nürnberg *et al.*, 1995). Im humanen Genom sind bislang 16 Gene bekannt, die für 23 $G\alpha$ -Proteine kodieren (Vanderbeld & Kelly, 2000). G-Proteine lassen sich auf der Basis struktureller und funktioneller Homologien in vier Subfamilien einteilen (Neer, 1995, Simon *et al.*, 1991): $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12}$. Einen Überblick über die G-Proteine zeigt Tabelle 1. Des Weiteren wurde 2009 mit G_v eine fünfte Klasse postuliert, die aber offensichtlich nicht bei Säugern vorkommt (Oka *et al.*, 2009).

Zwei bakterielle Exotoxine, Cholera toxin und Pertussis toxin, wechselwirken spezifisch mit dem G-Protein Aktivierungs-/Inaktivierungs-Zyklus und werden daher als nützliche Hilfsmittel für die Aufschlüsselung G-Protein-mediierter Signalkaskaden

angewendet. Cholera toxin (CTX), das Enterotoxin des Bakteriums *Vibrio cholera*, katalysiert die Übertragung eines ADP-Ribose-Restes auf ein Arginin einer $G\alpha_s$ - oder $G\alpha_t$ -Untereinheit, welches zu einer Inaktivierung der intrinsischen GTPase-Aktivität des G-Proteins führt und eine Daueraktivierung des Proteins zur Folge hat. Pertussis toxin (PTX), das Toxin des Keuchhustenerregers *Bordetella pertussis*, katalysiert die Adenosindiphosphat (ADP)-Ribosylierung der zur G_i -Familie gehörigen $G\alpha$ -Untereinheiten mit Ausnahme von G_z und der postulierten langen Spleißvariante von $G\alpha_{i2}$ (Wettschureck & Offermanns, 2005). Durch die irreversible ADP-Ribosylierung eines nur in Mitgliedern der G_i -Proteinfamilie vorkommenden, cysteinhaltigen Peptidmotivs in viertletzter Position des C-Terminus der $G\alpha$ -Untereinheit. Dadurch kommt es aus sterischen Gründen zu einer funktionellen Entkopplung der G_i -Protein α -Untereinheit/Rezeptor-Interaktion, so dass das G-Protein nicht mehr durch den Rezeptor aktivierbar ist. PTX führt zu einer Art funktionellem *knockout*, der bei Ausschaltung aller PTX-Substrate letal ist. PTX war daher lange Zeit das wichtigste Werkzeug, um die Struktur, Funktion und physiologische Bedeutung von Signalketten der G_i -Familie aufzuklären. Allerdings werden durch PTX-Behandlung unselektiv alle PTX-sensitiven G-Proteine inaktiviert. Eine funktionelle Zuordnung zu einzelnen G_i -Isoformen ist deshalb praktisch unmöglich. Auch weisen nicht alle Zellen eines Organismus eine vergleichbare Empfindlichkeit gegenüber PTX auf. So sind z. B. Thrombozyten oder Spermien weitgehend resistent gegenüber einer PTX-Behandlung.

Posttranslationale Modifikation

Die Lokalisierung von G-Proteinen an der Innenseite der Plasmamembran und an intrazellulären Membranen, v. a. an Membranen des endoplasmatischen Retikulums (ER) und Golgi, ist eine weitere Voraussetzung für eine effiziente Funktion bei der Signaltransduktion. $G\alpha$ -Untereinheiten werden posttranslational durch die kovalente Bindung der Fettsäuren Myristinsäure und/oder Palmitinsäure N-terminal modifiziert. Dadurch wird einerseits die Assoziation dieser Untereinheit mit der Plasmamembran ermöglicht. Andererseits sind diese Modifikationen wichtig für Interaktionen mit anderen Proteinen wie der Adenylzyklase, $G\beta\gamma$ oder auch den GPCRs (Moffett *et al.*, 2000, Peitzsch & McLaughlin, 1993). $G\alpha$ -Untereinheiten, die einen Defekt in der Membranbindung haben, sind nicht in der Lage, an Rezeptoren zu koppeln und die Aktivierung von Effektormolekülen zu veranlassen (Morales *et al.*, 1998).

G-Proteine werden nach ihrer Bildung im Zytoplasma nicht direkt an die Plasmamembran transferiert, sondern lokalisieren an die Membranen von intrazellulären Organellen wie z. B. dem Golgi und/oder ER. Bereits hier findet eine Lipidmodifikation

der $\beta\gamma$ -Untereinheit und vermutlich auch der α -Untereinheit statt, bevor es als heterotrimeres G-Protein zur weiteren Signaltransduktion an die Plasmamembran wandert (Marrari *et al.*, 2007). Intrazelluläre Organellen stellen für die G-Proteine aber nicht nur einen Zwischenstopp auf dem Weg zur Plasmamembran dar, sondern sind auch Orte von G-Protein-vermittelten, plasmamembranunabhängigen Signalkaskaden wie z. B. die Aktivierung einer PI3-Kinase über das G-Protein *G-protein alpha subunit 1* (GPA1), das an den Endosomen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* stattfindet (Slessareva *et al.*, 2006). Weiterhin ist bekannt, dass $G\beta\gamma$ am Golgi-Apparat die Bildung von Golgi-Vesikeln über Proteinkinase D- und Proteinkinase C-abhängige Signalkaskaden fördert (Bard & Malhotra, 2006, Diaz Anel & Malhotra, 2005).

G_s-Subfamilie

Für das zuerst entdeckte G-Protein, G_s (Pfeuffer, 1977) war die stimulierende Wirkung auf die Adenylylzyklase namensgebend. Es existiert in vier Spleißvarianten, die ubiquitär bzw. neuronal exprimiert werden und alle die für diese Familie typische CTX-Sensitivität zeigen (Bastepe *et al.*, 2002, Novotny & Svoboda, 1998). Zudem gehört das im Riechepithel und zentralen Nervensystem exprimierte G-Protein G_{olf} zur G_s-Familie. Beide G-Proteine besitzen die Eigenschaft die Adenylylzyklase zu stimulieren (Belluscio *et al.*, 1998, Jones & Reed, 1989, Luo *et al.*, 2002, Seifert & Wenzel-Seifert, 2002, Wadhawan *et al.*, 2008). Die Adenylylzyklase, die ATP in den sekundären Botenstoff cAMP umwandelt, kann als „klassischer Effektor“ von G α -Untereinheiten gesehen werden. Diese membranständigen Enzyme katalysieren die Umsetzung von ATP zu cAMP, welches als *second messenger* cAMP-abhängige Serin/Threonin-Kinasen, auch als Proteinkinasen A (PKA) bezeichnet, bindet und aktiviert (Meinkoth *et al.*, 1993). Eine Vielzahl verschiedener Proteine wird von PKAs phosphoryliert und in ihrer Aktivität moduliert, z. B. Rezeptoren, Ionenkanäle, der Transkriptionsfaktor CREB (*cAMP-response element-binding protein*) sowie Phosphodiesterasen. Letztere hydrolysieren cAMP und sorgen so für eine negative Rückkopplung cAMP-abhängiger Signalwege. Eine wichtige Rolle spielen die G α -Untereinheiten von G_s in Kohlenhydrat- und Fettstoffwechselvorgängen.

Das G α_s -Gen ist ein komplexes Gen, das genomische Prägung erfährt (*genomic imprinting*). Das Gen hat eine Größe von etwa 74kb, teilt sich auf 13 Exons und liegt auf dem Chromosom 10 (20q13.2) (Weinstein *et al.*, 2007). Es sind bisher 4 Spleißvarianten bekannt. Durch Imprinting wird beeinflusst welche Spleißvariante welchen Allels in der Zelle vorliegt. Während eine homozygote Inaktivierung des G α_s -Gens in Mäusen zur embryonalen Letalität bereits während der frühen Einnistungsphase

des Embryos führt (Yu *et al.*, 1998), zeigen heterozygote Mäuse, die entweder ein intaktes Allel vom Vater ($G\alpha_s$ (m- / p +)) oder der Mutter ($G\alpha_s$ (m + / p-)) geerbt haben, unterschiedliche phänotypische Erscheinungsformen, die nicht selten zum frühen postnatalen Tod der Tiere führen (Yu *et al.*, 1998). Eine heterozygote Mutation des mütterlichen Gens äußert sich u. a. in einer Albright-Osteodystrophie (*Albright hereditary osteodystrophy*; AHO). Bei der AHO kommt es aufgrund einer Resistenz gegenüber Parathyrin (PTH) zu einem Erscheinungsbild eines Hypoparathyroidismus mit Störungen der Skelettentwicklung wie z. B. Kleinwuchs, Übergewicht, Brachydaktylie und neurobiologischen Auffälligkeiten. Weiterhin zeigen diese $G\alpha_s$ (m - / p+)-Tiere eine schwere Adipositas, welche mit einem reduzierten Energieverbrauch und einer reduzierten Aktivität des sympathischen Nervensystems assoziiert ist, wohingegen eine väterlich vererbte Mutation des Gens zu einer starken Magerkeit mit vermindertem Serum-, Leber und Muskeltriglyzeriden und einer erhöhten Lipolyse in Adipozyten führt. $G\alpha_s$ (m- / p +)- und $G\alpha_s$ (m + / p-)-Mäuse, die nicht bereits postnatal versterben, zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Insulin und eine erhöhte insulinabhängige Glukoseaufnahme in die Skelettmuskulatur (Chen *et al.*, 2011).

$G\alpha_{olf}$ -defiziente Mäuse zeigen eine starke verminderte Reaktion auf viele Gerüche (Belluscio *et al.*, 1998). Da das olfaktorische System große Auswirkungen auf die Pflege und das mütterliche Verhalten bei neugeborenen Nagern ausübt, sterben die meisten $G\alpha_{olf}$ -defizienten Neugeborenen wenige Tage nach der Geburt aufgrund unzureichender Nahrungsaufnahme, und die wenigen überlebenden, weiblichen Tiere zeigen ein inadäquates mütterliches Verhalten, das zum Tod aller Neugeborenen dieser $G\alpha_{olf}$ -defizienten Mütter führt. Abgesehen von den Defekten im olfaktorischen System weisen überlebende $G\alpha_{olf}$ -defiziente Mäuse deutliche motorische Störungen wie Hyperaktivität auf (Belluscio *et al.*, 1998). Mutationen des $G\alpha_{olf}$ -Gens (*Gnal*) verursachen eine primäre Torsionsdystonie (Fuchs *et al.*, 2013).

Gq-Subfamilie

Die G_q -Familie besteht aus den PTX-insensitiven G-Proteinen G_q , G_{11} , G_{14} , G_{15} und G_{16} . Während G_{14} , das murine G_{15} und sein humanes Homolog G_{16} ein restriktives Expressionsmuster zeigen, kommen G_q und G_{11} , welches G_q in vielen Geweben bis auf Thrombozyten und dem Nervensystem kompensieren kann (Offermanns, 2006, Offermanns *et al.*, 1997b), nahezu ubiquitär vor (siehe auch Tabelle 1). Die Mitglieder dieser Familie stimulieren Phospholipasen vom C- β -Typ. Diese G-Protein-Familie ist für die IP_3 -vermittelte Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern verantwortlich (Blank *et al.*, 1991, Kozasa *et al.*, 1993, Rhee, 2001, Smrcka *et al.*, 1991).

Die Funktionen einzelner Mitglieder der $G\alpha_q$ -Familie im Rahmen der Entwicklung und Funktion des Gesamtorganismus sind an Mauslinien studiert worden, die inaktivierende Mutationen der jeweiligen Gene tragen. Während $G\alpha_q$ -defiziente Tiere durch zerebelläre Ataxie, Störungen der primären Hämostase und einer beeinträchtigten Atemwegs-Hyperreaktionsfähigkeit (AHR) charakterisiert sind (Borchers *et al.*, 2003, Offermanns *et al.*, 1998), zeigen $G\alpha_{11}$ -defiziente Mäuse nur leichte phänotypische Auffälligkeiten z. B. in Bezug auf die motorische Koordination (Hartmann *et al.*, 2004, Wettschureck & Offermanns, 2005). Darüberhinaus bedingen Mutationen des $G\alpha_{11}$ -Gens wahrscheinlich die familiäre hypokalzurische Hyperkalzämie (Nesbit *et al.*, 2013). In $G\alpha_{11}$ - sowie $G\alpha_q$ -defizienten Mäusen ist die Langzeit-Potenzierung, also die langandauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung, im Hippocampus beeinträchtigt (Miura *et al.*, 2002). Mäuse, die lediglich ein intaktes $G\alpha_q$ - oder $G\alpha_{11}$ -Allel tragen, sterben kurz nach der Geburt infolge kardialer Fehlbildungen; wohingegen $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ -doppeldefiziente Embryonen kraniofaziale Defekte zeigen und offenbar aufgrund einer Kardiomyozyten-Hypoplasie schon *in utero* sterben (Offermanns *et al.*, 1998). Weiterhin zeigt die spezifische Deletion von $G\alpha_q$ und $G\alpha_{11}$ in den Nebenschilddrüsen, dass diese $G\alpha$ -Proteine eine Rolle in der Hemmung der Parathyrin-Sekretion durch Kalzium spielen, was sich u. a. in Hyperparathyreoidismus zeigt (Wettschureck *et al.*, 2007).

G₁₂-Subfamilie

Beide Mitglieder der G_{12} -Familie, G_{12} und G_{13} , sind ebenfalls PTX-insensitiv und werden zwar ubiquitär, aber nur in geringen Mengen exprimiert (Simon *et al.*, 1991, Spicher *et al.*, 1994). Sie besitzen 67 % Sequenzidentität und sind weniger als 45 % homolog zu anderen G-Protein- α -Untereinheiten (Strathmann & Simon, 1991). Funktionell bedeutend für diese G-Protein-Familie sind u. a. die Stimulation des Na^+/H^+ -Austausches (Dhanasekaran *et al.*, 1994), die Regulation von c-Jun-N-terminalen Kinasen (Prasad *et al.*, 1995) und die Aktivierung von Rho-Proteinen (Buhl *et al.*, 1995). Direkte Effektoren sind Guaninnukleotid-Austauschfaktoren des Rho, z. B. p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF und LARG (Chen & Manning, 2001, Suzuki *et al.*, 2003, Wells *et al.*, 2002).

Funktionelle Unterschiede zwischen $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ sind aus Studien an $G\alpha_{13}$ -defizienten Mäuseembryonen, welche in der Mitte der Schwangerschaft etwa Tag E10.0, aufgrund eines angiogenetischen Defekts sterben, abzuleiten. $G\alpha_{13}$ -defiziente Embryonen zeigen einen fehlerhaften Aufbau des Gefäßsystems, was sich am stärksten im Dottersack und des Kopfmesenchyms des Embryos auswirkt (Offermanns *et al.*,

1997a, Sivaraj *et al.*, 2013). $G\alpha_{12}$ -defiziente Mäuse zeigen keine Auffälligkeiten in Bezug auf Wachstum, Verhalten, Immunsystem oder Fruchtbarkeit. Die Defekte in $G\alpha_{13}$ -defizienten Embryonen und Zellen zeigten sich auch in Gegenwart von $G\alpha_{12}$. $G\alpha_{12}$ -defiziente Mäuse mit nur einem intakten $G\alpha_{13}$ -Allel sterben *in utero*. Dies zeigt, dass $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ überlappende als auch unterschiedliche zelluläre und biologische Funktionen in der frühen Embryogenese erfüllen (Gu *et al.*, 2002, Kozasa *et al.*, 2011, Wettschureck & Offermanns, 2005).

G_i-Subfamilie

Das Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts gefundene G_i -Protein mediert die Rezeptor-abhängige Inhibierung verschiedener Adenylylzyklase-Isoformen (Bokoch *et al.*, 1984, Codina *et al.*, 1983, Codina *et al.*, 1984, Katada & Ui, 1982, Kaziro *et al.*, 1991). Die zur G_i -Familie gehörenden $G\alpha$ -Untereinheiten können – mit Ausnahme von $G\alpha_z$ – durch Pertussistoxin, das Toxin des Keuchhustenerregers *Bordetella pertussis*, ADP-ribosyliert werden, wodurch das G-Protein vom Rezeptor entkoppelt und somit inaktiviert wird. Sie werden aus diesem Grunde „Pertussistoxin-(PTX-) sensitive $G\alpha$ -Untereinheiten“ genannt. Zur G_i -Familie, die mittlerweile elf Mitglieder umfasst, gehören die drei G_i -Isoformen, $G\alpha_{i1-3}$ und möglicherweise eine G_{i2} -Spleißvariante $G_{i2(s)}$, Näheres siehe Einleitung, Kapitel 1.2.3 sowie die drei G_o -Isoformen, G_z , zwei Transduzine ($G_{t(f)}$ und $G_{t(c)}$) und Gustduzin ($G\alpha_{gust}$).

Das vorwiegend im Gehirn und in Blutplättchen exprimierte G_z , dessen α -Untereinheit die Adenylylzyklasen I und V inhibiert, unterscheidet sich nicht nur durch seine PTX-Insensitivität, sondern auch biochemisch deutlich von $G\alpha_i$ und anderen $G\alpha$ -Untereinheiten. So wird GTP durch die $G\alpha_z$ -Untereinheit viel langsamer hydrolysiert als bei den anderen $G\alpha_i$ -Untereinheiten (Casey *et al.*, 1990, Ho & Wong, 2001). Im Gegensatz zu anderen Aktivatoren der Thrombozyten wie z. B. Thrombin oder ADP ist die durch Adrenalin verstärkte und über $G\alpha_z$ vermittelte Thrombozytenaktivierung in $G\alpha_z$ -defizienten Mäusen stark vermindert (Wettschureck & Offermanns, 2005, Yang *et al.*, 2000). $G\alpha_z$ -defiziente Mäuse sind lebensfähig und zeigen keine großen phänotypischen Auffälligkeiten. Jedoch sprechen diese Tiere verändert auf psychoaktive Substanzen an. So sind in den mutanten Mäusen im Gegensatz zu den wildtypischen Mäusen die Kokain-induzierten Bewegungsabläufe erhöht sowie der antinozizeptive Effekt von Morphin reduziert (Yang *et al.*, 2000), was auf eine biologische Funktion von $G\alpha_z$ in neuronalen Signalprozessen weist. Weiterhin wurde in $G\alpha_z$ -defizienten Mäusen eine erhöhte Glukose-stimulierte Insulinsekretion (GSIS) der β -Zellen nachgewiesen, die über die nicht mehr durch $G\alpha_z$ -vorhandene Inhibierung der

Adenylylzyklase und einer dadurch erhöhten cAMP-Konzentration ausgeht (Kimple *et al.*, 2012, Kimple *et al.*, 2008).

Das G-Protein G_o (*other*) wird vorwiegend in Neuronen und neuroendokrinen Zellen exprimiert und stellt 0,5 % der Gesamtmenge der Membranproteine in Neuronen dar. G_o scheint, neben $G\alpha_{i2}$, eine Rolle in der Regulation der spannungsabhängigen L-Typ-Kalziumkanäle im Herzen einzunehmen (Chen *et al.*, 2001). Eine Inaktivierung des Gens *Gnao* führt zu kleineren und schwächeren Mäusen und zu einer geringeren Lebenserwartung. Weiterhin sind diese Tiere mit Zuckungen, gelegentlichen Krampfanfällen, einer erhöhten Motorik, einem extremen Rotationsverhalten und einer Hyperalgesie charakterisiert (Jiang *et al.*, 1998). Darüberhinaus zeigen elektrophysiologische Untersuchungen an den Neuronen dieser $G\alpha_o$ -defizienten Tiere, dass die Regulierung des Kaliumskanals GIRK und der spannungsabhängigen Kalziumkanäle über GPCRs auch ohne $G\alpha_o$ geschieht und weisen auf die kompensatorische Wirkung anderer G_i -Proteine, wahrscheinlich $G\alpha_{i3}$ und dessen $\beta\gamma$ -Untereinheit, hin (Berlin *et al.*, 2010, Dizayee *et al.*, 2011, Greif *et al.*, 2000, Jiang *et al.*, 1998). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Spleißvariante von $G\alpha_o$, $G\alpha_{o2}$, nicht aber andere Mitglieder der $G\alpha_{i/o}$ -Familie, vermutlich eine wichtige Rolle in der Regulierung der Glukose-induzierten Insulinsekretion durch β -Zellen darstellt. So scheint die durch Galanin-vermittelte Inhibierung der Insulinsekretion über den ATP-sensitiven Kaliumkanal sowie Kalziumkanal von $G\alpha_{o2}$ gesteuert zu sein (Tang *et al.*, 2012, Wang *et al.*, 2011).

Transduzin, das von lichtaktiviertem Rhodopsin stimuliert wird, aktiviert seinerseits eine cGMP-abhängige Phosphodiesterase (Kaupp & Koch, 1992). Studien, in denen $G\alpha_{t(r)}$ -defiziente Mäuse untersucht wurden, zeigen, dass ein Großteil der Fotorezeptoren in der Netzhaut dieser Tiere nicht mehr auf Lichtreize reagiert und mit zunehmendem Alter eine Netzhautdegeneration eintritt (Calvert *et al.*, 2000, Wettschureck & Offermanns, 2005). Das strukturell mit dem Transduzin aus den Stäbchen der Netzhaut eng verwandte Gustduzin vermittelt in olfaktorischen Sinneszellen die Geschmacksqualitäten bitter, süß und zudem auch die erstmals in Japan beschriebene Geschmacksqualität *umami* (He *et al.*, 2004, Li *et al.*, 2002). Die Mäuse, denen die α -Untereinheit von Gustduzin fehlt zeigen eine eingeschränkte Sinnesempfindung von bitter, süß und *umami* (Wettschureck & Offermanns, 2005). Eine Ablation von $G\alpha_{gust}$ äußert sich in einer beeinträchtigten trigeminalen Wahrnehmung (Tizzano *et al.*, 2010).

Tabelle 1: Klassifizierung der heterotrimeren G-Proteine nach ihren G α -Untereinheiten

Familie	Subtyp;	Vorkommen	Effektoren	<i>In vivo knockout</i> Phänotyp (Auswahl)	Literatur
G_s	G α_s ¹	ubiquitär	AC \uparrow	(-/-): frühe embryonale Lethalität; (-/+): erhöhte insulinabhängige Glukoseaufnahme in Muskeln; Albright-Osteodystrophie	(Chen <i>et al.</i> , 2011, Simon <i>et al.</i> , 1991, Yu <i>et al.</i> , 1998)
	G α_{olf}	olfaktorisches Epithel, Gehirn	AC \uparrow	Anosmie, beeinträchtigt Wachstum und Entwicklung bei Neugeborenen; beeinträchtigt Pflegeverhalten von Weibchen gegenüber dem Nachwuchs; Hyperaktivität; Mutationen im Gnal Gen verursachen eine Torsionsdystonie	(Belluscio <i>et al.</i> , 1998, Fuchs <i>et al.</i> , 2013, Simon <i>et al.</i> , 1991)
G_{i/o}	G $\alpha_{t(r,c)}$ ²	Retina, Geschmackszellen	cGMP-PDE \uparrow	Milde Netzhautablösung; G $\alpha_{t(c)}$ keine Mausmutante verfügbar	(Calvert <i>et al.</i> , 2000, Wettschureck & Offermanns, 2005)
	G α_{gust}	Geschmacksknospen, Bürstenzellen	PDE \uparrow	Eingeschränkte Sinnesempfindung von bitter, süß und umami; Beeinträchtigung der trigeminalen Wahrnehmung	(He <i>et al.</i> , 2004, Ruiz <i>et al.</i> , 2003, Tizzano <i>et al.</i> , 2010, Wettschureck & Offermanns, 2005)
	G α_{i1}	überwiegend neuronal	AC I, V, VI \downarrow , (G $\beta\gamma$: GIRK \uparrow , PLC β \uparrow)	Bisher kein auffälliger Phänotyp beschrieben	

Familie	Subtyp;	Vorkommen	Effektoren	<i>In vivo knockout</i> Phänotyp (Auswahl)	Literatur
	Gα _{i2} ³	ubiquitär	AC I, V, VI ↓, (Gβγ: GIRK ↑, PLCβ ↑, PI3K ↑)	Entzündliche Darmerkrankungen mit einer höheren Anzahl an proinflammatorischen Zytokinen des Typs TH ₁ und einer erhöhten basalen Produktion von IL-12 in bestimmten APZ-Subpopulationen; Anomalien im Immunsystem führen zu einer Kolitis, häufiges Auftreten von Kolon-Adenokarzinomen aufgrund von chronischen Entzündungen; Beeinträchtigte Chemotaxis bei Makrophagen; Beeinträchtigte Zellmigration von Prostatakrebs	(He <i>et al.</i> , 2000, Ohman <i>et al.</i> , 2000, Rudolph <i>et al.</i> , 1995, Wiege <i>et al.</i> , 2012, Zhong <i>et al.</i> , 2012)
	Gα _{i3}	überwiegend nicht-neuronal	AC I, V, VI ↓, (Gβγ: GIRK ↑, PLCβ ↑, PI3K ↑)	Biologische Funktion in der Biogenese von Melanosomen im retinalen Pigmentepithel vermutet; Stammabhängige Skelettmissbildungen; Beeinträchtigung der Kinozilien und somit der Bewegungsrichtung der Haarbüschel an den Haarzellen der Hörschnecke	(Ezan <i>et al.</i> , 2013, Plummer <i>et al.</i> , 2012, Young <i>et al.</i> , 2011)
	Gα _{i2} /Gα _{i3}			Embryonale Lethalität Tag E 8.0 – E 8.5.	(Gohla <i>et al.</i> , 2007b, Wettschureck & Offermanns, 2005)
	Gα _{i1} /Gα _{i3}			Bisher kein auffälliger Phänotyp beschrieben	

Familie	Subtyp;	Vorkommen	Effektoren	<i>In vivo knockout</i> Phänotyp (Auswahl)	Literatur
	Gα _{o1, o2, o3}	neuronal, endokrin	AC↓, VDCC↓, (Gβγ: GIRK↑, PLCβ↑)	Wachstumsstörungen, beeinträchtigt postnatales Überleben, Zuckungen, gelegentliche Krampfanfälle, extremes Rotationsverhalten; Hyperalgesie; Verlust der Lichteempfindlichkeit der bipolaren ON-Zellen in der Netzhaut; Beeinträchtigte Glukose-induzierte Insulinsekretion	(Dhingra <i>et al.</i> , 2000, Jiang <i>et al.</i> , 1998, Tang <i>et al.</i> , 2012, Wang <i>et al.</i> , 2011, Wettschureck & Offermanns, 2005)
	Gα _z	neuronal, endokrin, Thrombozyten	AC I, V↓, (Gβγ: GIRK↑)	Mild ausgeprägte Defekte der Thrombozyten und des ZNS; Erhöhte Glukose-stimulierte Insulinsekretion (GSIS) der β-Zellen	(Hendry <i>et al.</i> , 2000, Kimple <i>et al.</i> , 2012, Kimple <i>et al.</i> , 2008, Yang <i>et al.</i> , 2002)
Gq	Gα _q	ubiquitär	PLCβ↑, Rho-GEF	Kleinhirn-Ataxie aufgrund einer mangelhaften Rückbildung von LTP, erhöhte Blutungszeit und Schutz vor Thromboembolien aufgrund eingeschränkter Blutplättchenaktivierung als Reaktion auf TXA ₂ , ADP und Thrombin; Hyperparathyreoidismus	(Borchers <i>et al.</i> , 2003, Miura <i>et al.</i> , 2002, Offermanns <i>et al.</i> , 1998, Simon <i>et al.</i> , 1991, Wettschureck <i>et al.</i> , 2007)
	Gα ₁₁	nicht-hämatopoetische Zellen	PLCβ↑, Rho-GEF	Die synaptische Übertragung im Hippocampus ist beeinträchtigt; Hypokalzurische Hyperkalzämie	(Hartmann <i>et al.</i> , 2004, Nesbit <i>et al.</i> , 2013, Wettschureck & Offermanns, 2005)
	Gα ₁₄	Hoden, Milz, Nieren, hämatopoetische Zellen	PLCβ↑	Bisher kein auffälliger Phänotyp beschrieben	(Wettschureck & Offermanns, 2005)

Familie	Subtyp;	Vorkommen	Effektoren	<i>In vivo knockout</i> Phänotyp (Auswahl)	Literatur
	Gα ₁₅ ; Gα ₁₆ ⁴	hämatopoetische Zellen	PLCβ↑	Bisher kein auffälliger Phänotyp beschrieben	(Davignon <i>et al.</i> , 2000)
	Gα _q /Gα ₁₁			Embryonale Lethalität <i>in utero</i> aufgrund einer Kardiomyozyten-Hypoplasie; Hyperparathyreoidismus	(Offermanns <i>et al.</i> , 1997b, Wettschureck <i>et al.</i> , 2007)
	Gα _q /Gα ₁₅			Phänotyp siehe Gα _q (-/-)	(Davignon <i>et al.</i> , 2000)
G12	Gα ₁₂	ubiquitär	Rho-GEF ↑	Bisher kein auffälliger Phänotyp beschrieben	(Gu <i>et al.</i> , 2002)
	Gα ₁₃	ubiquitär	Rho-GEF ↑	Defekte Angiogenese (lethal Tag E 9.5); eingeschränkte Blutplättchenfunktion: defekte Aktivierung der Blutplättchen	(Offermanns <i>et al.</i> , 1997a, Sivaraj <i>et al.</i> , 2013)
	Gα ₁₂ /Gα ₁₃			Gα ₁₂ /Gα ₁₃ : embryonale Lethalität Tag E 8.5; eingeschränkte Blutplättchenfunktion wie bei Gα ₁₃ -Defizienz	(Gu <i>et al.</i> , 2002, Kozasa <i>et al.</i> , 2011, Wettschureck & Offermanns, 2005)

¹Diverse Spleißvarianten von Gα_s. ²Gt(r) und Gt(c) bezeichnen Transduzine in Stäbchen- (*rod*) und Zapfenzellen (*cone*) der Retina. ³G_{i2}(l) zeigt keine Pertussistoxin-Sensitivität. ⁴Gα_{15/16} sind Speziesvarianten von Maus bzw. Mensch. AC: Adenylylzyklase; APZ: Antigen präsentierende Zelle; cGMP-PDE: cGMP-spaltende Phosphodiesterase; GIRK: Einwärts gleichrichtender Kaliumkanal, IL-12: Interleukin 12; PLC-β: Phospholipase C-β; PI3K: Phosphatidylinositol-3-Kinase; Rho-GEF: Guanin-nukleotid-Austausch-Faktor der monomeren GTPase Rho; T_H1: Typ-1-T-Helferzellen bzw. -Zytokine; IL: Interleukin; APZ: antigenpräsentierende Zellen; LTP: Langzeit-Potenzierung; TXA₂: Thromboxan-A₂; VDCC: Spannungsabhängiger Kalziumkanal; ↑ = Stimulation; ↓ = Hemmung. Tabelle modifiziert nach Nürnberg, 2004 und Wettschureck *et al.*, 2004.

G β - und γ -Untereinheit

Die β - und γ -Untereinheiten der G-Proteine lassen sich in der Regel nur unter denaturierenden Bedingungen voneinander trennen. Heterodimere G $\beta\gamma$ -Komplexe werden deshalb als „funktionelle Monomere“ angesehen (Hamm, 1998). Im Gegensatz zu G α -Untereinheiten besitzen G $\beta\gamma$ -Komplexe keine intrinsische Enzymaktivität und sind wesentlich lipophiler.

G β -Untereinheiten haben ein Molekulargewicht von 35 - 39 kDa. Der N-Terminus der G β -Untereinheit ist mit einer Länge von ungefähr 20 Aminosäuren α -helikal strukturiert. Ihm schließt sich ein Sequenz-Motiv an, das sich insgesamt sieben Mal wiederholt: das sogenannte WD40-repeat-Motiv (Neer *et al.*, 1994). Das WD40-repeat-Motiv besteht aus etwa 40 Aminosäuren, von denen nur wenige konserviert sind. An seinem Aminoterminus befinden sich die beiden Aminosäuren Glycin-Histidin (GH), am Carboxylende die Aminosäuren Tryptophan-Aspartat (WD), die dazwischenliegende Sequenz ist größtenteils variabel. Die sieben WD40-repeat-Motive von G β bilden eine propellerartige Tertiärstruktur (Sondek *et al.*, 1996) mit einer zentralen Kernpore. Jedes „Propellerblatt“ besteht aus vier kurzen, um sich gedrehten β -Blättern, wobei jede WD-Wiederholung in der G β -Aminosäuresequenz vier β -Faltblättern entspricht. Es sind mittlerweile fünf (einschließlich Spleißvarianten sieben) verschiedene G β -Isoformen bekannt. Die G β -Isoformen 1-4 sind sich strukturell sehr ähnlich (78 – 88 % Aminosäure-Identität) (Schwindinger & Robishaw, 2001). G β_5 unterscheidet sich (mit nur ca. 50 % Aminosäure-Identität) strukturell und funktionell deutlich von G β_{1-4} (Maier *et al.*, 2000, Snow *et al.*, 1998).

Die γ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine sind mit 6 - 8 kDa deutlich kleiner als G α und G β . Man kennt bisher zwölf G γ -Isoformen (G γ_{1-5} und G γ_{7-13}) die in drei Gruppen unterteilt werden. Sie zeigen untereinander eine höhere Diversität als die G β - und G α -Untereinheiten (nur 27 – 76 % Aminosäure-Sequenzhomologie) (Schwindinger & Robishaw, 2001). G γ -Untereinheiten werden durch Isoprenylierung eines Cystein-Restes innerhalb des sog. CAAX-Motivs im C-Terminus des Proteins posttranslational modifiziert (Casey & Seabra, 1996, Fukada *et al.*, 1990). Die meisten G γ -Untereinheiten besitzen ein Leucin als C-terminale Aminosäure des CAAX-Motivs, daher wird das innerhalb des Motivs liegende Cystein mit einem C₂₀-Geranylgeranyl-Rest modifiziert. Ist die letzte Aminosäure ein Serin, wie es bei den G γ_1 -, G γ_9 - und G γ_{11} -Isoformen der Fall ist, wird die G γ -Untereinheit C₁₅-farnesyliert (Ray *et al.*, 1995). Nach der Isoprenylierung der G γ -Untereinheit erfolgen die proteolytische Abspaltung des AAX-Restes und die Methylierung des nun C-terminalen Cysteins (Cook *et al.*, 1998). Der Isoprenyl-Rest ist für die Verankerung des G $\beta\gamma$ -Dimers in der

Zytoplasmamembran verantwortlich. Der N-Terminus der $G\gamma$ -Untereinheiten ist ebenso wie der N-Terminus der $G\beta$ -Untereinheit α -helikal strukturiert. Die beiden Helices von $G\beta$ und $G\gamma$ sind umeinander superspiralisiert (*coiled coil*). Der restliche Teil der $G\gamma$ -Untereinheit geht in einer ausgestreckten Konformation entlang den äußeren Bereichen von drei „Propellerblättern“ der $G\beta$ -Untereinheit hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen mit dieser ein (Sprang, 1997). Die Selektivität der Komplexbildung von $G\beta$ - und $G\gamma$ -Isoformen ist gering ausgeprägt (Clapham & Neer, 1997). Daher werden die heterotrimeren G-Proteine auch nach der Entdeckung der eigenen Signalwirkung der $G\beta\gamma$ -Komplexe immer noch nach ihren α -Untereinheiten klassifiziert.

Die aktive Rolle von $G\beta\gamma$ -Komplexen in der Signaltransduktion von Säugerzellen wurde erst viel später entdeckt als die der $G\alpha$ -Untereinheiten (Clapham & Neer, 1997, Jones *et al.*, 2004). G-Protein-regulierte, einwärts gleichrichtende K^+ -Kanäle (GIRK oder Kir3 Kanäle), waren die zuerst entdeckten Effektoren der $G\beta\gamma$ -Untereinheiten (Logothetis *et al.*, 1987).

1.2.2 G-Proteine und ihre Rolle im Energiestoffwechsel

G-Proteine spielen eine wichtige Rolle sowohl in endokrinen als auch metabolischen Vorgängen. So wird der Energiestoffwechsel von Glukose, Proteinen und Fetten, der durch das Verhältnis der Hormone Insulin und Glukagon bestimmt wird, antagonistisch durch die G_s - und G_i -vermittelte Signaltransduktion beeinflusst. Insulin erhöht die Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettgewebe und hemmt die hepatische Glykogenolyse und Glukoneogenese weshalb Insulin als primärer Regulator der Blutglukosekonzentration wirkt. Glukagon ist ein Peptidhormon, dessen Hauptaufgabe die Erhöhung des Glukosespiegels im Blut ist. Es wird in den α -Inselzellen der Bauchspeicheldrüse gebildet. Bei niedrigem Glukosespiegel wird Glukagon in die Blutbahn sezerniert und dort transportiert. Dieses katabole Hormon wie auch z. B. Adrenalin, Noradrenalin, Cortisol und das Wachstumshormon Somatotropin, ist in seiner Wirkung auf den Glukose-, Protein- und Fettsäurestoffwechsel ein Gegenspieler des Insulins. Diese wirken primär durch cAMP und die Proteinkinase A (PKA) bzw. werden durch das hypothalamisch-hypophysäre System gesteuert (Cortisol, Somatotropin). Glukagonrezeptoren werden hauptsächlich im Fettgewebe, wo es die Lipolyse und damit die Freisetzung von Fettsäuren initiiert, und in der Leber exprimiert, wo es die Glukosefreisetzung durch Aktivierung der Glykogenolyse und Glukoneogenese fördert. Glukagon in der Leber aber auch Adrenalin im Muskel und der

Leber aktivieren einen G_s -Protein gekoppelten Rezeptor durch den die Adenylylzyklase aktiviert und das sekundäre Effektormolekül cAMP gebildet wird. Das gebildete cAMP stimuliert über die PKA-Kaskade die Glykogenolyse und die Gluconeogenese, gleichzeitig sind der Glykogenaufbau (Glykogenese) und die Glykolyse gehemmt (Abbildung 3) (Authier & Desbuquois, 2008, Jiang & Zhang, 2003). Neben diesen schnellen, kurzfristigen Reaktionen am Hepatozyten reguliert cAMP langfristig die Biosynthese von Schlüsselenzymen der Gluconeogenese auf der Ebene der Transkription. Die Veränderung des Leberstoffwechsels als Antwort auf einen Glukagonstimulus ist somit auf erhöhte intrazelluläre cAMP-Konzentrationen zurückzuführen. Die aktivierte G_{α_i} -Untereinheit erzielt den gegenteiligen Effekt, indem die Adenylylzyklase inhibiert wird und damit die intrazelluläre cAMP-Konzentration verringert und in Folge dessen die Aktivität der PKA herabsetzt. Zudem scheint in Hepatozyten ein durch G_{α_q} -gekoppelter Signalweg ausgelöster Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration die Glykogenolyse und Gluconeogenese zu stimulieren. Die G_{α_q} -Untereinheit aktiviert die Phospholipase $C\beta$ (PLC β), die anschließend die Effektormoleküle Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1-4-5-triphosphat (Ins(1,4,5)P $_3$) generiert. DAG beeinflusst seinerseits die Proteinkinase C (PKC) und Ins(1,4,5)P $_3$ bewirkt die Freisetzung von Kalzium aus zellulären Speichern. Diese kurzfristige Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration löst ebenfalls eine Aktivierung der PKC aus. PKC phosphoryliert und inaktiviert damit die Glykogensynthase, die das wichtigste Enzym für die Glykogenbiosynthese darstellt (siehe Abbildung 3) (Jiang & Zhang, 2003). Welche GPCRs hierbei involviert sind, ist jedoch nicht bekannt (Hua *et al.*, 2013, Jiang & Zhang, 2003). Jedoch scheint auch Glukagon den Phospholipase $C\beta$ -Signalweg zu aktivieren (Authier & Desbuquois, 2008, Cho *et al.*, 2012). Desweiteren sind die durch die verschiedenen G-Protein-Untereinheiten aktivierten Kinasen PKA und PKC zusätzlich für die Phosphorylierung verschiedener *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), z. B. der *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), verantwortlich (Tsou & Bence, 2012). Die phosphorylierte ERK kann daraufhin vom Zytoplasma in den Nukleus translozieren und so z. B. die Transkription von Zielgenen beeinflussen.

Insulin stimuliert über die Bindung an den in der Plasmamembran verankerten Insulinrezeptor die Expression der Gene von Schlüsselenzymen der Glykolyse und der Glykogenese. Da Insulin die Phosphodiesterase aktiviert, trägt es zur Erniedrigung der intrazellulären cAMP-Spiegel und zur Antagonisierung der Glukagonwirkung bei. Dazu gehört auch die Hemmung der Expression gluconeogener Schlüsselenzyme durch Insulin (Saltiel & Kahn, 2001). G_i -Proteine sind in der Signalweiterleitung nach

Aktivierung des Insulinrezeptors beteiligt. Ende der 80er-Jahre ist gezeigt worden, dass ein experimentell induzierter Diabetes zum Verlust der G_i -Expression in der Mausleber führt (Gawler *et al.*, 1987). Die gezielte Inaktivierung von $G\alpha_{i2}$ in Mäusen blockiert charakteristische Insulinwirkungen und bewirkt dadurch Hyperinsulinämie, Insulinresistenz und verminderte Glukosetoleranz (Moxham & Malbon, 1996). Umgekehrt induziert die transgene Expression von konstitutiv aktivem $G\alpha_{i2}$ in Mäusen die Translokation des insulinsensitiven Glukosetransporters GLUT4 an die Plasmamembran und verbessert so die Glukosetoleranz (Song *et al.*, 2001).

Zusammen mit Glukose regulieren freie Fettsäuren die Insulinausschüttung und kürzlich wurde gezeigt, dass verschiedene GPCRs involviert sind. Diese GPCRs, GPR40 (G_q -gekoppelt), GPR41 (G_i -gekoppelt), GPR43 (G_i - und G_q -gekoppelt), GPR84 (G-Proteinfamilie bisher unbekannt), GPR119 (G_s -gekoppelt) und GPR120 ($G_{q/11}$ -gekoppelt) spielen eine entscheidende Rolle bei der metabolischen Regulation der Freisetzung von Insulin und der Glukosehomöostase (Kebede *et al.*, 2009, Talukdar *et al.*, 2011).

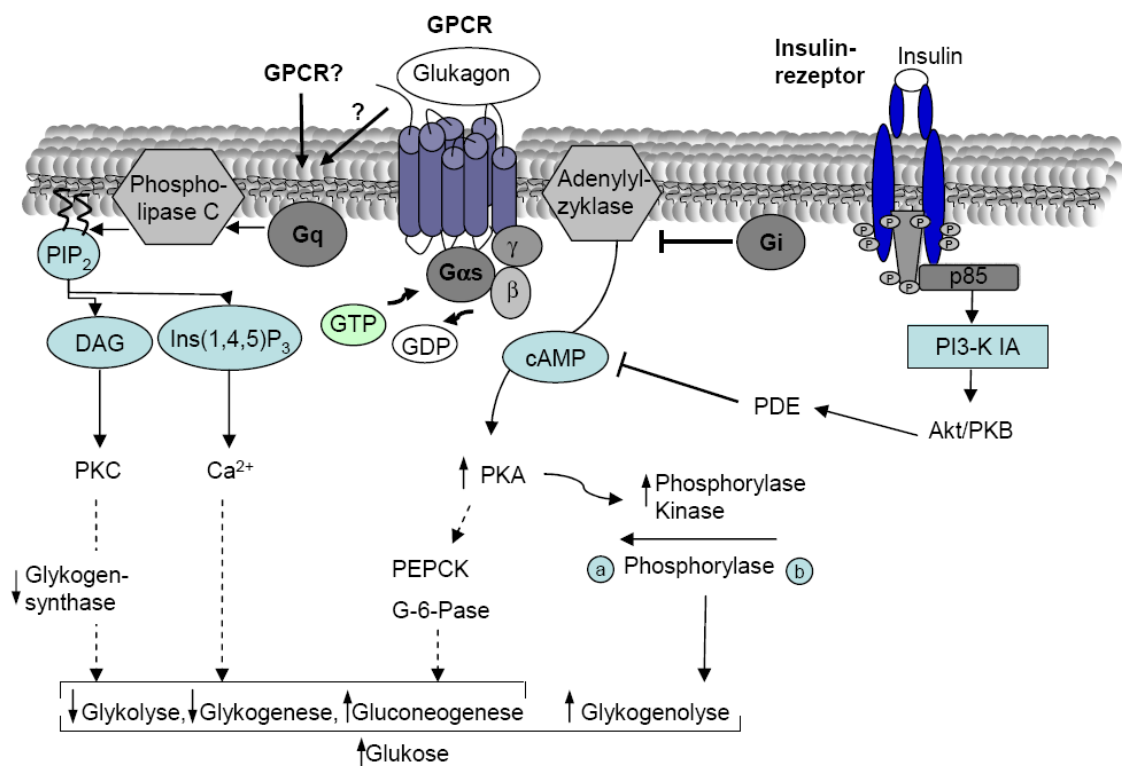


Abbildung 3. Glukagon- und Insulin-aktivierte Signalkaskaden

Nach der Aktivierung des Glukagonrezeptors kommt es zur Aktivierung des G-Proteins, welches aus der $G\alpha$ - und der $G\beta\gamma$ -Untereinheit besteht. Nach deren Dissoziation aktivieren die $G\alpha_s$ -Untereinheiten die Adenylylzyklase, die für einen intrazellulären cAMP-Anstieg und damit für die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) sorgt. $G\alpha_i$ -Untereinheiten inhibieren diesen Prozess. G_q -Proteine scheinen ebenfalls an der intrazellulären Glukosefreisetzung und -bildung beteiligt zu sein. Unbekannt ist jedoch, welcher GPCR hier involviert ist. $G\alpha_q$ -Untereinheiten aktivieren die Phospholipase β , durch die DAG und $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ gebildet werden. Dadurch wird die Proteinkinase C aktiviert und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration erhöht. Insulin wirkt der Glukagonwirkung entgegen indem es u.a. über die Phosphodiesterase (PDE) die Level an cAMP erniedrigt und zur Hemmung von gluconeogenen Schlüsselenzymen wie Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK) und Glukose-6-Phosphatase (G-6-Pase) beiträgt. Abbildung modifiziert nach (Jiang & Zhang, 2003).

1.2.3 $G\alpha_i$ -Proteine und ihre biologischen Funktionen

Die drei eng verwandten Isoformen $G\alpha_{i1-3}$ wurden ursprünglich nach ihrer Fähigkeit benannt, die Aktivität der Adenylylzyklase zu inhibieren (siehe Einleitung, Kapitel 1.2.1). $G\alpha_{i1}$ wird primär im Nervensystem gefunden, $G\alpha_{i2}$ wird ubiquitär exprimiert und repräsentiert die quantitativ vorherrschende $G\alpha_i$ -Isoform, und $G\alpha_{i3}$, das engste Homolog von G_{i1} , wird im Nervensystem kaum, aber in peripheren Geweben breit exprimiert. Die $G\alpha_{i1-3}$ -Isoformen besitzen 85–95 % Identität auf der Aminosäuresequenz-Ebene (siehe Abbildung 4), und zeigen partiell überlappende Expressionsmuster.

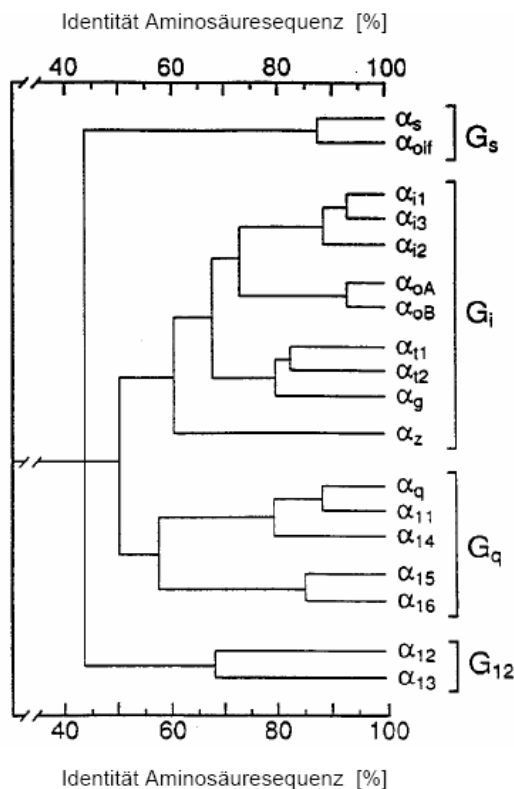


Abbildung 4. Aminosäuresequenz-Identität der vier heterotrimeren G-Protein Familien
Abbildung nach (Simon *et al.*, 1991).

Während aus dem singulären Gen, das für $G\alpha_s$ kodiert vier, und von dem für $G\alpha_o$ kodierenden Gen drei mRNA-Spleißvarianten gebildet werden, sind die drei $G\alpha_i$ -Isoformen über eine Tandem-Genduplizierung aus dem für G-Proteine kodierenden Stammgen entstanden (Wilkie *et al.*, 1992).

Die Mitglieder der $G\alpha_i$ -Familie sind bereits seit fast 30 Jahren bekannt, und obwohl zahlreiche biochemische und zellbiologische Arbeiten über die Rezeptorkopplung und über $G\alpha_i$ -Effektoren existieren, liegen erst vergleichsweise wenige Untersuchungen vor, die die biologische Funktion der $G\alpha_i$ -Isoformen im Organismus analysiert haben. Während die unselektive Inaktivierung der G_i -Proteine durch Pertussistoxin bereits Aufschluss über die fundamentale Rolle der G_i -Proteine z. B. bei Entzündungsprozessen geben konnte, ermöglichte erst die Inaktivierung der für die einzelnen $G\alpha_i$ -Isoformen kodierenden Gene im Mausmodell (Jiang *et al.*, 2002, Rudolph *et al.*, 1993) die Erforschung ihrer jeweiligen Funktionen. So zeigte der von Prof. Uwe Rudolph generierte $G\alpha_{i2}$ -knockout-Mausstamm in der Erstbeschreibung erstaunlicherweise einen relativ milden Phänotyp. Konstitutiv $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse zeigen eine Wachstumsretardierung und entwickeln eine diffuse, entzündliche Darmerkrankung (*inflammatory bowel disease*, IBD), welche in ihren klinischen und histopathologischen Merkmalen einer ulzerativen Kolitis ähnelt. IBDs sind durch eine dysregulierte mukosale T-Zellaktivität, aberrante Zytokin-Produktion, zelluläre Entzündung und eine daraus resultierende intestinale Gewebszerstörung gekennzeichnet. Obwohl die Phänotypen und die Pathogenese der IBDs heterogen sind, ist all diesen Erkrankungen eine gestörte Antwort CD4-positiver T-Zellen auf kommensale enterische Bakterien gemeinsam. Interessanterweise sind $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse durch derartige Defekte der Thymozytenreifung und -funktion charakterisiert (Zhang *et al.*, 2005). Auch Störungen der B-Zell-Entwicklung (Dalwadi *et al.*, 2003), sowie eine verminderte TGF β -Antwort peripherer T-Zellen sind in $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mausstämmen beschrieben worden (Wu *et al.*, 2005).

Die relativ moderaten Auswirkungen der Gendeletion für $G\alpha_{i2}$ beruhen wahrscheinlich in der funktionellen Kompensation durch die in den jeweiligen Zelltypen noch exprimierte $G\alpha_{i3}$ -Isoform (Gohla *et al.*, 2007b). So führt der Verlust einer $G\alpha_i$ -Isoform zur kompensatorischen Hochregulation einer anderen $G\alpha_i$ -Isoform (Rudolph *et al.*, 1996, Wiege *et al.*, 2013). Eine Kompensation einer Doppeldefizienz von $G\alpha_{i3}$ und $G\alpha_{i1}$ kann nicht durch $G\alpha_{i2}$ kompensiert werden wie z. B. der Aktivierung von Akt über den EGF-Rezeptor (Cao *et al.*, 2009). $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ weisen etwa 90 % Aminosäureidentität zueinander auf (Simon *et al.*, 1991), und können in Rekonstitutionsexperimenten mit gereinigten Proteinen weitestgehend füreinander

substituieren. So ist $G\alpha_{i2}$, nicht aber $G\alpha_{i3}$ notwendig für die C5a-induzierte Chemotaxis von Makrophagen (Wiege *et al.*, 2012). Hingegen können G_{i2} und G_{i3} bei der C5a-abhängigen Chemotaxis neutrophiler Granulozyten füreinander substituieren, und erst die funktionelle Entkopplung beider G_i -Proteine vom C5a-Rezeptor durch Pertussistoxin ist in der Lage, die gerichtete Migration von Granulozyten vollständig zu inhibieren (Wiege *et al.*, 2012). Weiterhin scheint, dass $G\alpha_{i2}$ (nicht aber $G\alpha_{i3}$) im Rahmen einer experimentellen pulmonalen Arthus-Reaktion der Maus essentiell für die Aktivierung alveolärer Makrophagen und die nachfolgende Induktion der Entzündungsantwort durch Rekrutierung von PMNs ist (Skokowa *et al.*, 2005).

In Übereinstimmung mit der Hypothese, dass der Verlust singulärer $G\alpha_i$ -Isoformen *in vivo* funktionell durch andere $G\alpha_i$ -Isoformen zumindest partiell kompensiert werden kann, führt der vollständige Verlust der peripheren G_i -Proteine in $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ -doppeldefizienten Mäusen schon *in utero* zu einer frühembryonalen Letalität derzeit noch unbekannter Ursache. Eine $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ -Doppeldefizienz führt zu keinen lebensfähigen Nachkommen, das auf die funktionelle Redundanz dieser $G\alpha_i$ -Isoformen hinweisen könnte. Stattdessen sind stark wachstumsretardierte Nachkommen auffindbar, die meistens schon vor dem embryonalen Tag 10 *intrauterin* versterben. Auch $G\alpha_{i2}^{(-/-)}/G\alpha_{i3}^{(+/-)}$ -Mäuse sind *extrauterin* nicht lebensfähig (Gohla *et al.*, 2007b). Interessanterweise werden jedoch $G\alpha_{i2}^{(+/-)}/G\alpha_{i3}^{(-/-)}$ -Mäuse lebend geboren. Auffällig ist, dass diese Tiere bislang keine ulzerative Kolitis entwickeln, wie für $G\alpha_{i2}^{(-/-)}$ -defiziente Mäuse beschrieben wurde (Rudolph *et al.*, 1995). $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Proteine scheinen trotz ihrer hohen Aminosäuresequenzähnlichkeit aber auch unterschiedliche und damit nicht redundante Funktionen zu besitzen. Beispielsweise zeigen Untersuchungen zur Immunantwort im Rahmen einer experimentell ausgelösten Arthus-Reaktion in der Lunge, dass $G\alpha_{i2}$ in Alveolarmakrophagen eine spezifische Rolle erfüllt, welche nicht durch $G\alpha_{i3}$ kompensiert werden kann (Skokowa *et al.*, 2005). Auch gibt es Untersuchungen die zeigen, dass $G\alpha_{i2}$ spezifisch mit dem Insulinrezeptor assoziiert und möglicherweise eine Funktion bei der Autophosphorylierung des Rezeptors besitzt (Kreuzer *et al.*, 2004).

Es ist derzeit ungeklärt, ob die beobachteten Phänotypen vor allem auf Gendosis-Effekte zurückzuführen sind und $G\alpha_i$ -Isoformen redundante Rollen haben, oder ob die einzelnen $G\alpha_i$ -Isoformen auch *in vivo* spezifische Funktionen ausüben.

Die von Dr. Karsten Spicher, im Labor von Prof. Lutz Birnbaumer erzeugten, konstitutiven $G\alpha_{i3}$ -*knockout*-Mäuse sind lebensfähig und fertil, weisen jedoch stammabhängig kraniofaziale Verwachsungen und Skelettmissbildungen auf (Plummer *et al.*, 2012). Weiterhin konnte in Studien über den okulären Albinismus Typ 1 (OA1) gezeigt werden, dass OA1, ein GPCR welcher auf Melanosomen lokalisiert ist, mit $G\alpha_{i3}$

in der Regulierung der Melanosomenbiogenese involviert ist (Young *et al.*, 2011, Young *et al.*, 2008).

Dass G α -Proteine nicht ausschließlich an der Plasmamembran zu finden sind und nicht ausschließlich über GPCRs reguliert werden, zeigte sich bereits ein paar Jahre nach der Entdeckung der G α_i -Proteine durch den Fund von G α_{i2} im Zytosol von neutrophilen Granulozyten (Rudolph *et al.*, 1989). Auch neuere Befunde weisen auf eine intrazelluläre Signalkaskade durch endomembranständige G-Proteine hin, wie schon erwähnt die Aktivierung von G α_{i3} über OA1 an Melanosomen oder die Aktivierung einer PI3-Kinase über GPA1, dem Hefe-Homolog vom mammalen G α_{i3} , an den Endosomen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Calebiro *et al.*, 2009, Slessareva *et al.*, 2006, Young *et al.*, 2008, Young *et al.*, 2011). Mittlerweile konnte durch die Entdeckung der AGS-Proteine (siehe auch AGS-Proteine, Kapitel 1.2.1) die Hypothese unterstützt werden, dass heterotrimere G-Proteine auch unabhängig von heptahelikalen Rezeptoren signalisieren können (De Vries L. *et al.*, 2000, Pattingre *et al.*, 2003). Überdies scheinen G α_i -Proteine auf intrazellulären Membranen zu lokalisieren und an Prozessen der Endo- und Exozytose beteiligt zu sein (Ahnert-Hilger *et al.*, 1998, Le-Niculescu *et al.*, 2005, Nürnberg & Ahnert-Hilger, 1996, Van Dyke, 2004, Wullschleger *et al.*, 2006). In Nieren- und Pankreaszellen konnte gezeigt werden, dass insbesondere G α_{i3} an Golgimembranen lokalisiert (Hermouet *et al.*, 1992, Stow & de Almeida, 1993, Valenti *et al.*, 1998). Weiterhin wird G α_{i3} in endozytotischen Kompartimenten in proximalen Tubulusepithelzellen der Niere (Denker *et al.*, 1996) sowie in Rattenhepatozyten gefunden (Lou *et al.*, 2002).

Anfang der 1990er Jahre zeigten Studien eine Rolle der GTP-bindenden Proteine in der autophagischen Sequestrierung, einem Prozess der u. a. von fundamentaler Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase ist (siehe Kapitel 1.2). Hierbei wird die autophagische Sequestrierung durch GTP γ S, einem nicht hydrolysierbaren GTP-Analogon, gehemmt (Kadowaki *et al.*, 1994). Die Arbeitsgruppe von Prof. Patrice Codogno zeigte mit Untersuchungen an der Kolonkarzinomzelllinie HT-29, dass heterotrimere G-Proteine der Pertussistoxin (PTX)-sensitiven G $_i$ -Familie, insbesondere G α_{i3} , eine Rolle während der autophagischen Sequestrierung zu haben scheint (Ogier-Denis *et al.*, 1996, Ogier-Denis *et al.*, 2000, Ogier-Denis *et al.*, 1995, Pattingre *et al.*, 2003, Petiot *et al.*, 1999, Van Dyke, 2004).

1.3 Autophagie

1.3.1 Prinzip und Mechanismus der Autophagie

Die autophagische Proteolyse stellt einen ubiquitären und hormonell strikt regulierten degradierenden Prozess dar, über den intrazelluläre Proteine unter Bildung von Autophagosomen bis zu einzelnen Aminosäuren abgebaut werden können (Petiot *et al.*, 2002, Xie & Klionsky, 2007, Yorimitsu & Klionsky, 2005). Autophagie bedeutet wörtlich aus dem Griechischen übersetzt: ein Selbstessen bzw. Selbstverdau (griech. *auto* = selbst; *phagos* = essen). Die Autophagie nimmt durch den Abbau langlebiger Proteine eine wichtige Funktion in der Entwicklung und Differenzierung, sowie im Metabolismus ein.

In diesem Prozess wird zytoplasmatisches Zellmaterial in eine expandierende Membran, einem sogenannten Phagophor sequestriert, welches sodann zu einem doppel- bzw. multimembranärem Vesikel, dem Autophagosom, heranreift (Eskelinen, 2005). Aus welchen Membranen das Phagophor ursprünglich gebildet wird, war lange Zeit nicht geklärt. Bereits vor Jahrzehnten schlugen Prof. Christian de Duve und Kollegen vor, dass das Phagophor von bereits existierenden Membranen wie dem glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) oder dem Golgi abgeleitet sei (De Duve *et al.*, 1955, De Duve & Wattiaux, 1966). Aufgrund des geringen Auftretens von transmembranären Proteinen in den autophagosomalen Membranen wurde lange Zeit über eine *de novo*-Prozessierung des Phagophors aus einer *core*-Membran, also einer Membran, die den Prozess initialisiert und die durch Anlagerung verschiedener Vesikel expandiert diskutiert (Kirisako *et al.*, 1999, Mizushima *et al.*, 2003, Mizushima *et al.*, 2001, Xie & Klionsky, 2007, Yorimitsu & Klionsky, 2005). Neuere Untersuchungen lassen auf einen Ursprung der autophagosomalen Membran aus ER und Mitochondrien vermuten (Hailey *et al.*, 2010, Kornmann *et al.*, 2009, Tooze & Yoshimori, 2010, Yla-Anttila *et al.*, 2009, Young *et al.*, 2008) und bestätigen die Vermutung von De Duve, der das ER als Ursprung für das Phagophor sah (siehe oben). Auch eine Beteiligung der Plasmamembran an der Bildung der prä-autophagosomalen Strukturen über die Clathrin-vermittelte Endozytose wird diskutiert (Ravikumar *et al.*, 2010).

Das gebildete Autophagosom kann zwar z. B. zytoplasmatisches Material umschließen, ist *per se* aber nicht proteolytisch aktiv. Erst wenn das Autophagosom mit frühen oder späten Endosomen zu einem sogenannten Amphisom fusioniert, um anschließend mit einem Lysosom zu fusionieren bzw. direkt mit einem Lysosom zu einem sogenannten Autolysosom fusioniert, kann das sequestrierte Material (sowie die innere

Membran des autophagischen Vesikels) enzymatisch abgebaut werden (De Duve & Wattiaux, 1966, Ericsson, 1969). Die so entstandenen Makromoleküle werden durch die lysosomalen Membranpermeasen für die weitere zelluläre Nutzung, z. B. für die Proteinsynthese, Glukoneogenese, Enzymsynthese etc., ins Zytosol abgegeben (Klionsky, 2007, Xie & Klionsky, 2007, Yorimitsu & Klionsky, 2005). Weitere Details werden ausführlich in Kapitel 1.3.3 beschrieben. Das Prinzip der autophagischen Proteolyse ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt.

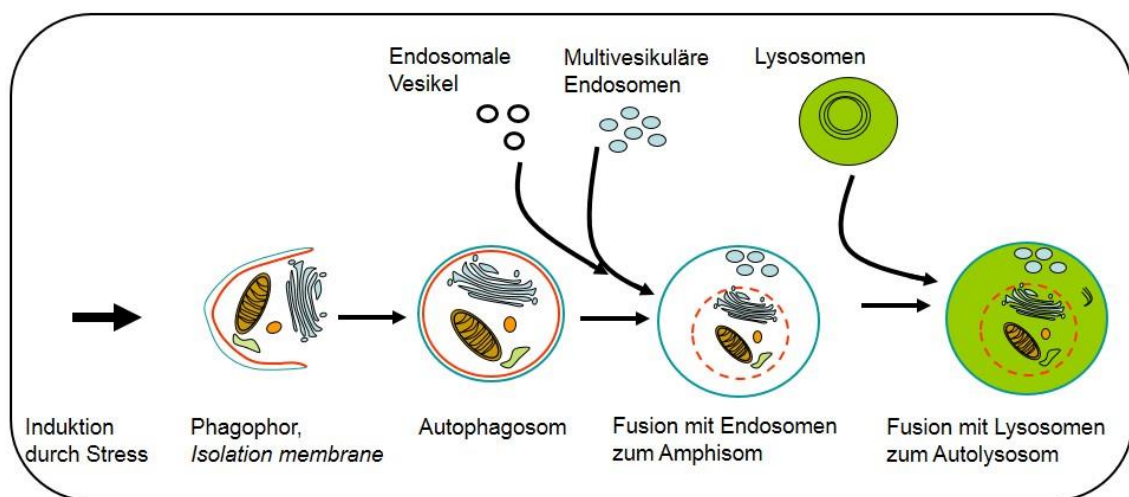


Abbildung 5. Prinzip des autophagischen Prozesses in Säugerzellen

Durch unterschiedlichste Stress-Signale wird in Zellen die autophagische Proteolyse ausgelöst. Hierzu bildet sich eine doppelmembranäre „Isolationsmembran“, welche zytosolatisches Material oder auch Organellen wie Mitochondrien oder endoplasmatisches Retikulum umschließt. Durch Elongation und Schließen der Membranen bildet sich das sog. Autophagosom. Nach Fusion des Autophagosomes mit Endosomen und Lysosomen kann das eingeschlossene Material degradiert werden. Weitere Erklärungen im Text. Schema modifiziert und abgeleitet nach (Eskelinen, 2005).

Die Erforschung der autophagischen Proteolyse als einen lysosomalen Abbauweg begann bereits im Jahre 1955 mit der Entdeckung des Lysosoms durch Christian de Duve (De Duve *et al.*, 1955), der Lysosomen erstmals in der Rattenleber entdeckte und dafür 20 Jahre später den Nobelpreis erhielt. Clark und seine Kollegen erkannten 1957 (Clark, 1957) mit Hilfe der Elektronenmikroskopie eine degradative Eigenschaft dieser Vakuolen. De Duve war es schließlich, der auf einem Symposium in 1963 erstmals den Begriff *Autophagie* prägte. Es folgten darauf weitere Forschungsarbeiten, welche die Sequestrierung von Zytoplasma und Organellen in geschlossene, membranäre Vesikel, sogenannte autophagische Vakuolen, ultrastrukturell zeigten (De Duve & Wattiaux, 1966, Ericsson, 1969). Obwohl der autophagische Prozess erstmals vor etwa 40 Jahren beschrieben wurde, beginnen wir erst seit einer Dekade, die molekularen Zusammenhänge in diesem Prozess zu verstehen. Hierbei ist der lysosomale-autophagische Prozess von einer nicht-lysosomalen Degradation klar zu trennen. Der nicht-lysosomale

Abbau wird durch die Ubiquitin-Proteasom-vermittelte Proteolyse realisiert. Das Proteasom baut solche Proteine ab, die vorher mit Ubiquitin „markiert“ wurden (Hershko & Ciechanover, 1998).

Es sind verschiedene extra- und intrazelluläre Signale bekannt, durch die Autophagie stimuliert wird. So kann die autophagische Proteolyse sehr effizient durch Nährstoffentzug oder durch ATP-Mangel ausgelöst werden (Edinger & Thompson, 2004, Klionsky, 2004, Meijer & Codogno, 2006). Die zugrunde liegenden Signaltransduktionskaskaden, die nach „Hungerung“ zur Induktion der Autophagie führen sind jedoch noch zum großen Teil unerforscht.

Insbesondere die Leber verfügt über außerordentlich effektive Mechanismen um die Aktivität der autophagischen Proteolyse zu kontrollieren. Unter basalen Bedingungen stellen Autophagosomen in Leberzellen 0,5 % des Zellvolumens dar (Tanaka *et al.*, 2000). Werden isolierte, kultivierte Hepatozyten gehungert, so können pro Stunde bis zu 5 % des gesamten intrazellulären Materials durch autophagische Proteolyse verdaut werden (Seglen & Bohley, 1992).

1.3.2 Physiologische und pathologische Bedeutung der Autophagie

Im Gegensatz zur selektiven Degradation von (generell kurzlebigen) Proteinen über den proteasomalen, Ubiquitin-vermittelten Degradationsweg trägt die Autophagie maßgeblich zur „Massen“-Degradation (*bulk degradation*) von (typischerweise langlebigen) Proteinen sowie zum Umsatz von Organellen bei. So ermöglicht die autophagische Proteolyse, dass sich die Zelle an veränderte Bedingungen wie z. B. an oxidativen Stress oder an Stress durch Nährstoffmangel anpassen kann. Die Autophagie stellt daher eine physiologische, adaptive Antwort auf den Hungerzustand dar (Reggiori & Klionsky, 2005). In multizellulären Organismen besitzt die Autophagie wichtige Funktionen im Rahmen von Entwicklung, Immunantwort und programmiertem Zelltod (*programmed cell death*, PCD), sowie z. B. auch als Mechanismus der Tumorsuppression und in der Neuroprotektion (Boland & Nixon, 2006, Levine & Klionsky, 2004, Schmid & Munz, 2007). Die Stimulation der Autophagie als Reaktion auf einen Nährstoff- bzw. Energiemangel ermöglicht der Zelle ein Überleben, da die Autophagie in einem solchen Fall eine alternative Energiequelle für den Organismus bereitstellt. In Extremsituationen, z. B. bei andauerndem Energiemangel oder bei schwerwiegenden Zellschädigungen, wird jedoch der so genannte autophagosomale Zelltod (Programmierter Zelltod Typ II, PCD II) – ein nicht-apoptotischer, programmierter Zelltod – eingeleitet (Levine & Yuan, 2005).

Während Autophagie also essentiell für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase im adulten Säuger-Organismus ist, ist sie in solchen Geweben erhöht, die während der Differenzierung und Entwicklung remodelliert werden. Darüberhinaus scheint Autophagie auch durch Elimination ROS-geschädigter Mitochondrien in Alterungsprozessen eine Rolle zu spielen (Bergamini *et al.*, 2007, Rubinsztein *et al.*, 2011, Scherz-Shouval & Elazar, 2007). Zusätzlich zu diesen physiologischen Funktionen ist die Autophagie auch in der Kanzerogenese, bei neurodegenerativen Erkrankungen wie bei *Morbus Parkinson*, *Morbus Huntington* und *Morbus Alzheimer*, bei Kardiomyopathien sowie bei Erkrankungen der Skelettmuskulatur impliziert worden (Cuervo, 2004, Shintani & Klionsky, 2004).

Weiterhin kann die Induktion der Autophagie zur Elimination von Mikroorganismen beitragen und somit antiinfektiöse Funktionen haben, obwohl einige Mikroorganismen auch Strategien entwickelt haben, um die autophagische Maschinerie zu subvertieren. So können einige Bakterien die Fusion autophagosomaler Vesikel mit dem lysosomalen Kompartiment verhindern und so in die Autophagosomen eindringen (Nakagawa *et al.*, 2004, Schmid *et al.*, 2006, Schmid & Munz, 2007).

1.3.3 Verschiedene Arten der Autophagie

Proteine können das Lysosom über dreierlei Wege erreichen: Mikro- oder Makroautophagie sowie über die Chaperon-vermittelte Autophagie (*chaperone mediated autophagy*, CMA). Abbildung 6 gibt einen Überblick über die diversen, bekannten Mechanismen der Autophagie-Induktion.

Sowohl Mikro- als auch Makroautophagie sind Prozesse, bei denen Teile des Zytoplasmas unspezifisch sequestriert, und anschließend lysosomal degradiert werden. Während bei der Makroautophagie autophagosomale Vesikel gebildet werden, die dann mit Lysosomen fusionieren, erfolgt die Degradation des Zytoplasmas im Rahmen der Mikroautophagie direkt durch eine Einstülpung der Lysosomenmembran – es gibt also kein zwischengeschaltetes Transportvesikel. In der Literatur wird unter Autophagie allgemein die Makroautophagie verstanden. Spezialfälle der Mikroautophagie stellen die *piecemeal* Mikroautophagie des Nukleus (PMN) sowie die Pexophagie dar. Während des PMN-Prozesses erfolgt eine Einstülpung des Nukleus in die Vakuole in der das nukleäre Material von Hydrolasen abgebaut wird. Die selektive Degradation von Peroxisomen in Hefe sowie Säugerzellen findet mit der Pexophagie statt. Peroxisomen können über Mikropexophagie (direkt) und Makropexophagie (über Autophagosomen) in die Vakuole gelangen. Obwohl Pexophagie sich von der durch Hungerung induzier-

ten Autophagie unterscheidet, beruhen beide Prozesse auf der Verwendung desselben Satzes an Proteinen (Ezaki *et al.*, 2011, Hutchins *et al.*, 1999, Monastyrska & Klionsky, 2006, Yuan *et al.*, 1999).

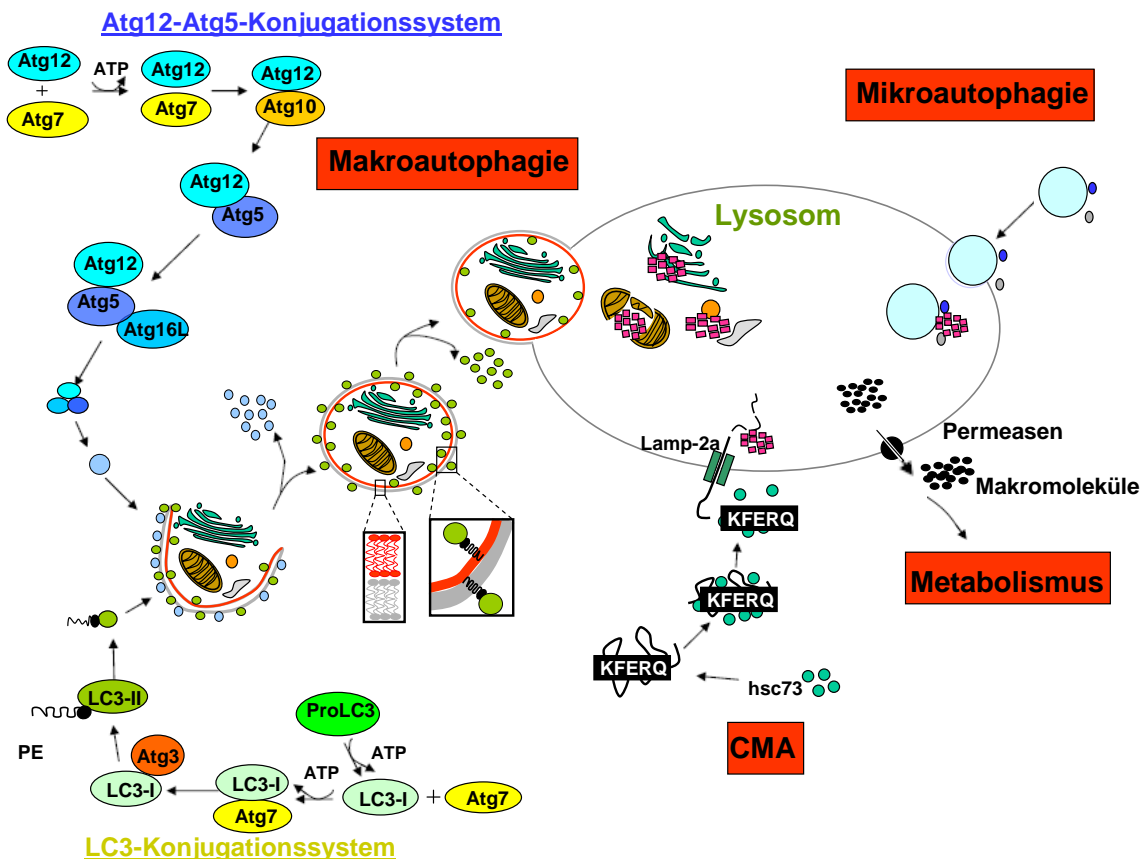


Abbildung 6. Molekulare Mechanismen der Autophagie in Säugerzellen

CMA = chaperone mediated autophagy; hsc73 = heat shock cognate protein, 73 kDa; LAMP-2a = lysosomal associated membrane protein type 2a. PE = Phosphatidylethanolamin; Atg = autophagy related gene; KFERQ = steht für das Pentapeptidmotiv Lys-Phe-Glu-Arg-Gln. MAP-LC3 (kurz: LC3) = microtubule-associated protein light chain 3. Nach Initiation der Makroautophagie sind die beiden Ubiquitin-ähnlichen Konjugationssysteme Atg12-Atg5-Atg16L und LC3 verantwortlich für die Bildung und Elongation sowie die Reifung des Autophagosoms. Während der Atg12-Atg5-Atg16L-Komplex vor der Reifung der autophagosomalen Membran wieder ins Zytoplasma abdissoziiert, verbleibt das lipid-modifizierte LC3-II auf dem Autophagosom und wird im Lysosom degradiert. Abbildung modifiziert nach (Vicencio *et al.*, 2008). Weitere Einzelheiten siehe Text (siehe Kapitel 1.3.3 und 1.3.4).

Bei der Chaperon-vermittelten Autophagie (CMA) werden Proteine mit einem KFERQ-ähnlichen Motiv von *heat shock cognate protein of 73 kDa* (hsc73) Chaperon (mit Hilfe von Ko-Chaperonen) erkannt und zum Lysosom geführt, wo sie mit Hilfe des *lysosomal membrane-associated protein 2a* (LAMP-2A) in das Lumen des Lysosoms gelangen und dort abgebaut werden. Eine konstitutive, selektive Art der Autophagie stellt der *cytoplasm-to-vacuole-targeting* (Cvt)-Weg dar, der ausschließlich in *S. cerevisiae* vorkommt. Anders als die „klassische“, katabole Autophagie stellt der Cvt-

Weg in erster Linie einen biosynthetischen Prozess dar (Hutchins *et al.*, 1999, Kim & Klionsky, 2000, Lynch-Day & Klionsky, 2010, Scott *et al.*, 2001).

1.3.4 Molekulare Regulation der Autophagie

1992 gelang erstmals die Anreicherung autophagischer Vesikel aus den Vakuolen Proteinase-defizienter *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme (Baba *et al.*, 1994, Takeshige *et al.*, 1992). Dies war ein Meilenstein für die molekulare Analyse autophagischer Prozesse. Auf der Suche nach Hefe-Mutanten, in der keine Anreicherung dieser Vesikel erfolgte, wurden genetische Screens verschiedener Arbeitsgruppen im Hefe-System durchgeführt (Noda *et al.*, 1995, Tian *et al.*, 2010, Tsukada & Ohsumi, 1993). Dies brachte den Durchbruch im Feld der Autophagie-Forschung, da nun die Funktionen der involvierten „Autophagie-Gene“ und die molekularen Zusammenhänge dieses lange bekannten Degradationsprozesses aufgeschlüsselt werden konnten. Ursprünglich Apg-Proteine (*Autophagy*) und Aut-Proteine (*Autophagy*) genannt, fand man im Jahr 2003 eine einheitliche, gemeinsame Nomenklatur: Atg-Proteine (*Autophagy-related gene*) (Klionsky *et al.*, 2003). Mittlerweile konnte das 36. Atg-Protein (Atg36) in der Hefe identifiziert werden (Motley *et al.*, 2012). Viele dieser Atg-Gene sind evolutionär konserviert (Levine & Klionsky, 2004, Meijer *et al.*, 2007, Mizushima *et al.*, 2011). Mit Hilfe weiterer Forschungsarbeiten in komplexeren Systemen wie *Caenorhabditis elegans*, *Dictyostelium discoideum*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* sowie in Säugetier-Zelllinien wurden die Zusammenhänge der molekularen Vorgänge der Autophagie klarer. Vor allem durch Gen-Deletionen von Atg-Proteinen in der Maus, wurde zudem die Relevanz der Autophagie für verschiedene patho- und physiologische Prozesse deutlich (siehe Kapitel 1.3.2).

1.3.4.1 Molekulare Komponenten in der Autophagosomenbildung

Das Prinzip des autophagischen Prozesses ist bereits in Kapitel 1.3.1 und Abbildung 5 erläutert worden. So sind mindestens 20 Atg-Gene für die Bildung von Autophagosomen notwendig (Klionsky *et al.*, 2003). Darunter sind zwei Ubiquitin-ähnliche Konjugationssysteme in Hefe sowie in Säugerzellen identifiziert worden (Ohsumi, 2001): das Atg12-Atg5-Konjugationssystem sowie das LC3 (Atg8)-Konjugationssystem. Das Atg12-Atg5-Konjugationssystem initiiert die Elongation des Präautophagosoms, wohingegen das LC3-Konjugationssystem für die Bildung und Reifung des Autophagosoms verantwortlich ist (Chen & Zhong, 2012, Kabeya *et al.*, 2000, Mizushima *et al.*, 2001).

1.3.4.2 Das Atg12-Atg5-Konjugationssystem

Das C-terminale Glycin von Atg12 wird durch Atg7 unter ATP-Verbrauch konjugiert und auf das Protein Atg10 übertragen. Interessanterweise ist Atg7 homolog zu E1-Ubiquitin-aktivierenden Enzymen. Das Atg10, welches einem E2-Ubiquitin-konjugierenden Enzym entspricht, katalysiert die kovalente Bindung einer Carboxy-Gruppe des Atg12 mit der ϵ -Aminogruppe eines Lysins von Atg5. Dieser Komplex geht dann eine nicht-kovalente Bindung mit Atg16L (*Autophagy-related gene 16-like protein*) ein. Das C-terminale Ende von Atg16L, welches eine WD40-Propeller Domäne aufweist, führt zur Ausbildung eines multimeren 800 kDa großen Multiprotein-Komplexes (Ishibashi *et al.*, 2011, Mizushima *et al.*, 2003). Der Atg12-Atg5-Atg16L-Komplex lokalisiert an die Vorstufe des Autophagosoms und verbleibt dort bis zu dessen Reifung, also der Schließung des Vesikels, um anschließend davon zu dissoziieren (siehe hierzu auch Abbildung 5).

1.3.4.3 Das LC3-Konjugationssystem

Microtubule-associated protein light chain 3 (MAP-LC3, kurz: LC3) ist das Mammalia-Ortholog des Hefe-Proteins Atg8. Die Bildung des Atg12-Atg5-Komplexes ist die Voraussetzung für die Rekrutierung von LC3 an präautophagosomale Membranen (Mizushima *et al.*, 2001, Radoshevich *et al.*, 2010). Das C-terminale Arginin des Vorläufers Prä-LC3 wird durch Atg4, eine Cystein-Aspartase, abgespalten; dadurch entsteht das sog. aktivierte zytosolische LC3-I mit einem terminalen Glycinrest. Anschließend kann, katalysiert durch Atg7 und Atg3, Phosphatidylethanolamin (PE) auf den terminalen Glycinrest von LC3-I übertragen werden. Dieses lipidmodifizierte sogenannte LC3-II besitzt eine hohe Affinität für Membranen und assoziiert selektiv mit autophagosomalen Membranen. Während LC3-II sowohl mit der inneren als auch mit der äußeren Membran der Präautophagosomen und mit ausgereiften Autophagosomen assoziiert und dort bis zur Fusion mit Lysosomen verbleibt (das intra-autophagosomale LC3-II wird anschließend durch die lysosomalen Hydrolasen degradiert), löst sich der Atg12-Atg5-Komplex bereits vor der terminalen Fusion mit Lysosomen von den Autophagosomen ab.

Zur intrazellulären Markierung autophagischer Vesikel wurde in der Vergangenheit oft Monodansylcadaverin (MDC) genutzt. Dies ist eine fluoreszierende Substanz, welche saure Kompartimente, wie die mit Lysosomen fusionierten Autolysosomen, anfärbt. MDC kann allerdings nur für die Visualisierung der späten Schritte des autophagosomalen Prozesses, die Fusion der Autophagosomen mit den Lysosomen, genutzt werden und nicht für den gesamten Ablauf der Autophagie. Schon länger ist der molekulare Mechanismus des LC3-Konjugationssystems bekannt, jedoch ist bisher die

genaue Funktion von LC3 unklar gewesen. Vor kurzem zeigten Nakatogawa et al. in Hefe, dass Atg8-PE (LC3-II) für die Membranbindung zwischen Liposomen wichtig ist und zur Hemifusion von Lipidmembranen führt, was letztlich die Expansion und Kompletierung der autophagosomalen Membran ermöglicht (Nakatogawa *et al.*, 2007). Daher wird LC3 als einziger spezifischer Marker für Autophagosomen betrachtet (Kimura *et al.*, 2009, Klionsky *et al.*, 2008), da LC3 vom Zeitpunkt der Bildung bis hin zur autophagolysosomalen Degradation des Autophagosoms auf diesen Membranen verbleibt (Mizushima, 2004).

1.3.4.4 Die Insulin- und Aminosäurevermittelte Regulation der Autophagie

Eine Vielzahl von Stressbedingungen kann autophagische Prozesse induzieren; daher ist auch eine Reihe von Signalwegen an der Regulation der Autophagie beteiligt. Obwohl die molekularen Mechanismen, die zur Aktivierung und Inhibition der Autophagie führen, erst ansatzweise bekannt sind, ist klar, dass Phosphatidylinositid-3-Kinasen (PI3K) eine zentrale Rolle spielen. Während Klasse I PI3-Kinasen die Autophagie inhibieren, stimulieren Klasse III PI3-Kinasen die autophagische Proteolyse indem sie wahrscheinlich an der Biogenese der Autophagosomenmembran beteiligt sind (Dennis *et al.*, 2001, Lavallard *et al.*, 2012, Meijer & Codogno, 2004, Sarbassov *et al.*, 2005, Wullschleger *et al.*, 2006). Insulin bewirkt die Rekrutierung und die nachfolgende Aktivierung von Klasse I_A Phosphatidylinositid 3-Kinasen an plasmamembranständige Insulinrezeptorkomplexe (Meijer & Codogno, 2006). PI3-Kinasen katalysieren als heterodimere Funktionseinheiten, bestehend aus einer katalytischen (p110 α, β oder δ) und einer regulatorischen Untereinheit (p85), die Bildung des intrazellulären Botenstoffes Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) durch Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in 3'-Stellung des Inositolringes. Dadurch kommt es zur Aktivierung weitere Enzyme wie *phosphoinositide-dependent protein kinase 1* (PDK-1) und Proteinkinase B (PKB/Akt) (Hawkins *et al.*, 2006). Akt phosphoryliert das *tuberous sclerosis* (TSC2)-Protein und verhindert so die Bildung des TSC1/2-Komplexes (Hamartin-Tuberin-Komplexes). Dies führt zu einer Erniedrigung der GAP-Funktion des Komplexes und resultiert in einer erhöhten Anzahl von *Ras homolog enriched in brain* (Rheb) in der GTP-Modifikation. Rheb-GTP wiederum bewirkt eine Aktivierung von *mammalian target of rapamycin* (mTOR), einer für die Regulation von Zellwachstum und Metabolismus essentiellen, konservierten Serin/Threonin-Kinase (Wullschleger *et al.*, 2006), siehe Abbildung 7. Der inhibitorische Effekt von Aminosäuren auf die Autophagie scheint auf die Hemmung von Klasse III PI3-Kinasen zu beruhen (Wurmser & Emr, 2002) sowie über die Rag GTPasen zu verlaufen. Klasse III PI3-Kinasen setzen Phosphatidylinositol (PIP) zu

Phosphatidylinositol-3-phosphat (PIP₃) um. Sowohl die Generierung von PIP₃ (Petiot *et al.*, 2000), als auch die Assoziation der Kinasen mit dem Tumorsuppressorprotein Beclin 1 (Liang *et al.*, 1999), wirken Proteolyse-fördernd.

Bei der Regulation der Autophagie fungiert mTOR als zentrale Schaltstelle da sowohl PI3-Kinase-abhängige als auch –unabhängige Signale in der Aktivierung von mTOR münden. mTOR kommt in Säugerzellen in zwei verschiedenen Komplexen vor: mTOR Komplex 1 (mTORC1) besteht aus mTOR, *G-protein β subunit like protein* (G β L) und *regulatory associated protein of mTOR* (Raptor). Eine Aktivierung von mTORC1 führt zur Phosphorylierung von zwei Schlüsselproteinen, welche die Translation von Proteinen regulieren: *eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein-1* (4EB-P1) und *p70 ribosomal protein S6 kinase 1* (S6K1). mTORC1 hemmt die Autophagie unter basalen Nährstoffbedingungen, indem es Atg13 phosphoryliert. Die Phosphorylierung von Atg13 beeinträchtigt eine Komplexbildung mit ULK1, und hemmt so die von Atg13-ULK1 ausgehende Regulierung der Autophagosomengröße (Cheong *et al.*, 2005, Stephan *et al.*, 2009). mTORC1 ist Rapamycin-empfindlich. Rapamycin (Sirolimus), ist ein makrozyklisches Immunsuppressivum (Vezina *et al.*, 1975), das die Kinaseaktivität von mTOR inhibiert, und dadurch die Autophagie induziert (Blommaart *et al.*, 1997). Auch in der über Aminosäure-vermittelten Inhibierung der Autophagie über das Protein Rag spielt mTORC1 eine wichtige Rolle. So scheint die V-Typ-ATPase in der Lysosomenmembran als Sensor für intralysosomale Aminosäuren zu fungieren. Bei einer erhöhten Konzentration an intralysosomalen Aminosäuren kommt es zu einer Konformationsänderung dieser ATPase, welche in einer erhöhten Bindung des Proteins Ragulator an die Lysosomenmembran resultiert. Ragulator wiederum bindet Rag an die Lysosomenoberfläche, das die Translokation von mTORC1 an die Lysosomen fördert und dadurch aktiviert wird (Kim *et al.*, 2008).

Der zweite Komplex, mTORC2, besteht aus mTOR, G β L und *rapamycin-insensitive companion of mTOR* (Rictor), einem Rapamycin-unempfindlichen Protein und *mammalian stress-activated protein kinase interacting protein 1* (mSIN1). mTORC2 wird durch Rapamycin also nicht gehemmt. mTORC2 aktiviert PKB/Akt durch Phosphorylierung an der Ser⁴⁷³-Position und reguliert das Zellwachstum. mTOR ist ein negativer Regulator der Autophagie, obgleich die mTOR-Effektoren, welche in der Regulierung des autophagischen Prozesses in Säugern involviert sind, noch nicht ausreichend bekannt sind (Rubinsztein *et al.*, 2007).

Unabhängig von mTOR erfolgt die Aminosäure-vermittelte Inhibierung von Autophagie über die Ras/Raf/MEK/ERK1/2-Signalkaskade. *G alpha interacting protein*

(GAIP) aktiviert die autophagische Sequestrierung durch Stimulation der $G\alpha_{13}$ -GTPase-Aktivität. GAIP ist ein ERK1/2-MAP-Kinase-Substrat, dessen Phosphorylierung und damit Aktivierung durch Aminosäuren Raf-1-abhängig inhibiert wird (Lavallard *et al.*, 2012). Wenn genügend Nährstoffe wie Wachstumsfaktoren, Insulin oder Aminosäuren vorhanden sind, erfolgt eine Phosphorylierung von mTOR an Serin²⁴⁴⁸ über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg. Abbildung 7 zeigt ein schematisches Modell der autophagischen Regulation *via* mTOR.

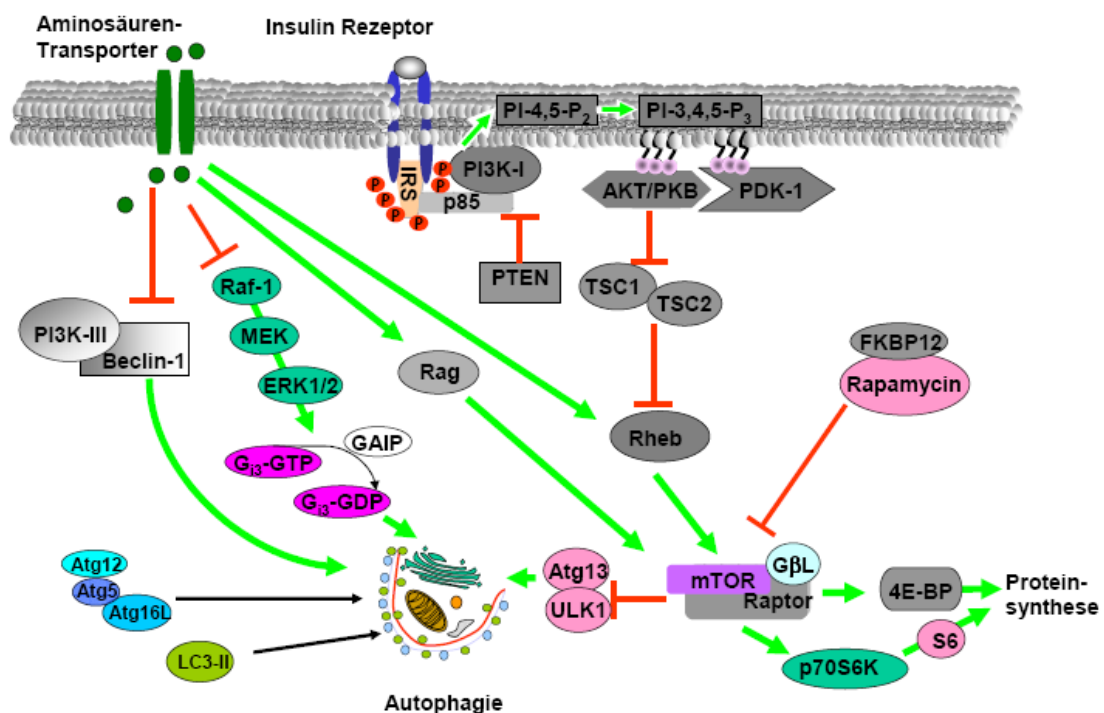


Abbildung 7. Rolle von PI3 Kinase und mTOR für die Regulation der Autophagie

4E-BP = eukaryotic initiation factor 4E (eIF-4E) binding protein 1, p70S6K = p70 ribosomal protein S6 kinase 1, S6 = ribosomal protein S6, PTEN = phosphatase and tensin homolog, TSC1/2 = tuberous sclerosis complex 1/2, Rheb = Ras homolog enriched in brain, Rag = regulatory associated protein of mTOR, FKBP12 = FK506 binding protein of 12 kDa, AKT/PKB = Proteinkinase B, PDK-1 = phosphoinositide-dependent protein kinase 1, PI3K-I = Phosphoinositid-3-Kinase Klasse I, PI3K-III = Phosphoinositid-3-Kinase Klasse III, (MAP)LC3-II = (microtubule-associated protein) light chain 3-II, Atg13 = Autophagy-related gene 13, ULK1 = Serin/Threonin-Proteinkinase, mTOR = mammalian target of rapamycin, IRS = Insulin-Rezeptor-Substrat; Raf-1 = RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase; MEK = Mitogen-activated protein kinase kinase; ERK1/2 = Extracellular-signal Regulated Kinases. Die Aktivierung des Insulinrezeptors durch Wachstumsfaktoren wie Insulin, führt zur Autophosphorylierung des Insulinrezeptors sowie von den Insulinrezeptor-assoziierten Insulin-Rezeptor-Substratproteinen (IRS). IRS-Proteine fungieren als Adapterproteine, an denen Liganden wie Mitglieder der Klasse I PI3-Kinasen binden und somit an der Membran aktiviert werden können. PI3-Kinasen phosphorylieren dann PIP₂ an der 3'-Position. Das daraus resultierende PIP₃ fördert als second messenger die Bindung von Akt und seinem Aktivator Phosphoinositid-abhängige-Kinase I (PDK-1). Akt phosphoryliert schließlich weitere Effektoren, was zu einer Aktivierung der Serin/Threonin-Kinase mTOR und darüber zu einer Inhibition der Autophagie führt. Aminosäuren inhibieren die proteolytische Autophagie einerseits durch die Aktivierung von Rheb und somit mTOR, andererseits unabhängig von mTOR über die Inhibition des Klasse III PI3-Kinase/Beclin 1-Komplexes. Grüne Linien signalisieren eine Aktivierung, rote Linien eine Inhibition. Einzelheiten zu den jeweiligen Signalwegen sind im Text wiedergegeben, siehe Kapitel 1.3.4.4. Abbildung modifiziert nach (Lavallard *et al.*, 2012, Meijer & Codogno, 2004).

2 *FRAGESTELLUNG*

G-Proteine sind wesentliche Komponenten der transmembranären Signalweiterleitung durch G-Protein-gekoppelte Zelloberflächenrezeptoren. Durch die Analyse gendefizienter Mausstämmen ist es in den letzten Jahren gelungen, die Mitglieder der $G\alpha_s$ -, $G\alpha_q$ - und $G\alpha_{12}$ -Familien in ihren biologischen Funktionen gut zu charakterisieren, wohingegen dies bei den Mitgliedern der $G\alpha_i$ -Familie nur teilweise gelang. Insbesondere ist unklar, welche spezifischen Funktionen die drei G_i -Isoformen im Organismus spielen. Aufgrund der hohen Aminosäureidentität von $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ geht man in der Literatur von redundanten Funktionen aus. Da jedoch jede Isoform durch ein eigenes Gen kodiert wird, postulieren wir unabhängige Funktionen der drei $G\alpha_i$ -Proteine. Zur Überprüfung dieser Annahme erschien uns $G\alpha_{i3}$ am interessantesten, da es in allen bekannten Geweben wesentlich geringer als $G\alpha_{i2}$ exprimiert wird. Zudem ist es vorwiegend nicht-neuronal zu finden und stellt dort deshalb zusammen mit $G\alpha_{i2}$ die einzigen $G\alpha_i$ -Proteine dar. Folglich sollte eine phänotypische Auffälligkeit in $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen auf eine spezifische Funktion des Proteins hindeuten, die durch $G\alpha_{i2}$ nicht kompensiert werden kann. Auf der Suche nach $G\alpha_{i3}$ -spezifischen Funktionen stießen wir auf Befunde an Kolonkarzinom-Zelllinien, die die Beteiligung von $G\alpha_i$ -Proteinen, insbesondere $G\alpha_{i3}$, an der autophagischen Sequestrierung vermuten ließen. Allerdings war nichts über die Rolle individueller $G\alpha_i$ -Proteine bei der Regulation der Autophagie in der Leber bekannt. Primäres Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb, die Bedeutung von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ bei der hepatischen Autophagie zu charakterisieren. Hierzu sollten tierexperimentelle Untersuchungen mit konstitutiv G_i -defizienten Mäusen durchgeführt, sowie Hepatozyten und embryonale Fibroblasten dieser Tiere charakterisiert werden. Im Einzelnen sollten folgende Fragen bearbeitet werden:

- ⇒ Charakterisierung der subzellulären Lokalisation der $G\alpha_{i3}$ -Isoform und einer möglichen Assoziation mit autophagosomalen Endomembranen
- ⇒ Analyse Autophagie-assoziiierter Proteine in $G\alpha_{i3}$ -defizienten Zellen
- ⇒ Charakterisierung des Phänotypes von $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen

Zur Beantwortung dieser Fragen sollte zunächst die Isolierung und Kultivierung von murinen Hepatozyten etabliert und biochemische und zellbiologische Methoden zur Analyse der autophagischen Aktivität entwickelt werden. In Langzeitstudien sollten außerdem basale physiologische Parameter von $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen charakterisiert werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Allgemein:

Pipetten Reference® (variabel)	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage <i>Precisa 100M-300C</i>	Precisa Gravimetrics, Dietikon, Schweiz
pH-Meter 525	WTW, Weilheim i. Obb.
Laser-Scan-Mikroskop <i>LSM 510</i>	Carl Zeiss, Jena
Mikrotiterplatten-Spektrophotometer <i>Fluostar Optima</i>	BMB Labtech, Offenburg
Thermocycler <i>Mastercycler</i>	Eppendorf, Hamburg
Ultrathurax <i>EuroThurax T20b</i>	IKA Labortechnik, Staufen
Ultraschall-Homogenisator <i>Sonopuls 70</i>	Bandelin, Berlin
Fotoentwicklermaschine <i>Curix 60</i>	Agfa, Köln

Maushaltung im Rahmen der Langzeitstudie:

Isolator	Isotec Systems, Bicester, UK
----------	------------------------------

Hepatozyten-Isolierung:

Wasserbad/Thermostat HK-P2	Haake, Vreden
peristaltische Pumpe <i>Minipuls 2</i>	Gilson, Villiers Le Bel, Frankreich
Oxygenator	Laborwerkstatt, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Elektrophorese:

Mini-Elektrophorese-System <i>Protean II</i>	BioRad, München
Elektrophoresis <i>Power Supply EPS 600</i>	Pharmacia Biotech, Hamburg
Semidry SD Kammer <i>Trans Blot</i> ®	BioRad, München

Mikroskopie:

Laser-Scanning-Mikroskop <i>LSM 510</i>	Carl Zeiss, Jena
Inverses Lichtmikroskop <i>Axiovert 25</i>	Carl Zeiss, Jena
Inverses Epifluoreszenz Mikroskop <i>TE2000-E</i>	Nikon, Düsseldorf
Kaltlichtlampe <i>KL2500 LCD</i>	Carl Zeiss, Jena

Zentrifugation:Eppendorf Tischzentrifuge *5415D*Sigma *3K30**Avanti J-20XP*Ultrazentrifuge *Sorvall OTD55B*Ultrazentrifuge *Optima LE-80K*

Rotor Typ 70 Ti

Rotor Typ 75 Ti

Rotor TH-641

Eppendorf, Hamburg

Sigma, Osterode am Harz

Beckman Coulter, Krefeld

Sorvall, Asheville, USA

Beckman Coulter, Krefeld

Beckman Coulter, Krefeld

Beckman Coulter, Krefeld

Sorvall, Asheville, USA

3.1.2 Hersteller und Lieferanten

- (1) Amersham Biosciences, Freiburg
- (2) Abgent, San Diego, USA
- (3) Abcam, Cambridge, United Kingdom
- (4) Axis-Shield PoC, Dundee, Schottland
- (5) ATCC/LGC Standards GmbH, Wesel
- (6) Applichem, Darmstadt
- (7) Biomol, Hamburg
- (8) Biochrom AG, Berlin
- (9) BD/Falcon, Bedford, USA
- (10) Bio-Rad, München
- (11) BD Biosciences Clontech, Heidelberg
- (12) BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg
- (13) B. Braun Melsungen AG, Melsungen
- (14) Cell Signaling Technology, Danvers, USA
- (15) Calbiochem *via* Merck, Darmstadt
- (16) DAKO, Glostrup, Dänemark
- (17) DETAKTA Isolier- und Meßtechnik GmbH & Co.
- (18) Fuji Photo Film GmbH, Düsseldorf
- (19) Fluka *via* Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- (20) Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
- (21) Missouri S&T cDNA Resource Center, Rolla, USA
- (22) MBL *via* MoBiTec GmbH, Göttingen
- (23) MP Biomedicals, Aurora, USA

- (24) Neolab, Heidelberg
- (25) Nano tools, Teningen
- (26) Novus Biologicals Inc, Littleton, USA
- (27) Gibco BRL, Eggenstein
- (28) GE Healthcare Europe GmbH, München
- (29) Genaxxon Bioscience GmbH, Biberach
- (30) Invitrogen, Karlsruhe
- (31) MitoSciences Inc, Eugene, USA
- (32) Merck, Darmstadt
- (33) Marienfeld, Lauda-Königshofen
- (34) Millipore, Eschborn
- (35) Missouri S&T cDNA Resource Center, Missouri, USA
- (36) Operon Biotechnologies GmbH, Köln
- (37) PAA Laboratories GmbH, Österreich
- (38) Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA
- (39) Promega *via* Serva, Heidelberg
- (40) Qiagen, Hilden
- (41) Roche Diagnostics, Mannheim
- (42) Roth, Karlsruhe
- (43) Saliter, Obergünzburg
- (44) Stratagene, Heidelberg
- (45) Santa Cruz, Heidelberg
- (46) Squarix GmbH, Marl
- (47) Schering, Berlin
- (48) Schleicher & Schuell, Dassel
- (49) Sorvall, Asheville, USA
- (50) Serva, Heidelberg
- (51) Sigma, Deisenhofen
- (52) TPP, Trasadingen, Schweiz
- (53) Whatman, Maidstone, UK

3.1.3 Chemikalien

- Aceton (32)
- Ammoniumperoxodisulfat (APS) (10)

Agarose	(29)
Ammoniumhydrogencarbonat	(51)
Bromphenolblau	(49)
Calyculin A	(15)
Kalziumchlorid	(32)
Coomassie Brilliant Blue G-250	(39)
Kollagen R (Typ I) Lösung 0,2%	(50)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	(32)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	(32)
Dithiothreitol (DTT)	(51)
4', 6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	(51)
Ethylendiamin-N,N,N,N'-tetraessigsäure (EDTA)	(49)
Essigsäure	(32)
Ethanol	(32)
Ethidiumbromid	(32)
Formaldehyd (40%)	(51)
Magermilchpulver	(43)
D(+)-Glukose	(32)
Glycerin	(32)
β -Glycerophosphat	(51)
Glycin-Phenyl- β -Naphthylamid (GPN)	(51)
Glycin	(49)
HEPES	(42)
Imidazol	(51)
Kaliumdihydrogensulfat	(32)
Kaliumchlorid	(32)
Magnesiumchlorid	(32)
Manganchlorid	(51)
Methanol	(32)
β -Mercaptoethanol	(6)
N, N'- Methylenebisacrylamid (Bisacrylamid)	(42), (49)
Natriumchlorid	(32)
Natriumacetat	(32)
Natriumhydrogencarbonat	(32)
Natriumsulfat	(32)

Natriumlaurylsulfat (SDS)	(51)
Natriumorthovanadat	(32)
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	(32)
Nonidet P40 (NP-40)	(41)
Okadaische Säure	(15)
Paraformaldehyd	(51)
PMSF	(49)
Ponceau S	(49)
Isopropanol	(42)
Rapamycin	(51)
Rinderserumalbumin (BSA, Fraktion V)	(49)
Salzsäure	(32)
Saccharose	(32)
N,N,N',N'- Tetramethylethylenediamine (TEMED)	(42)
Trichloressigsäure	(32)
Trypanblau	(8)
Tris	(32), (49)
Triton X-100	(51)
Triton X-114	(51)
Tween 20	(6)
Vinblastin	(51)
Urea >98%	(51)

Alle hier nicht aufgeführten Substanzen wurden von den Firmen Merck (Darmstadt) bzw. Sigma (Deisenhofen) mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* bezogen.

3.1.4 Enzyme, Proteine, Peptide und andere biologisch aktive Substanzen

E-64-d	(7)
Kollagenase Typ CLS-II-22 (Trockensubstanz), spez. Aktivität: 125-250 Mandl-Einheiten/mg, aus <i>Clostridium histolyticum</i>	(8)
Protease Inhibitor Cocktail	(41)
Glucagon, human	(15)
Insulin, Rind	(51)
Aprotinin	(6)

Leupeptin Hemisulfat	(6)
Pepstatin A	(15)
Pertussistoxin (aus <i>Bordetella pertussis</i>)	(15)

3.1.5 Antikörper

Tabelle 2: Primärantikörper

Spezifität	Spezies	Bezeichnung (Klon)	Hersteller	Verdünnung
G α_{i3}	Kaninchen	Eluat „C“, siehe 3.2.3.3	(46)	IB, 1:5000; IF, 1:1000
G α_{i2}	Kaninchen	Eluat „C“, siehe 3.2.3.3	(46)	IB, 1:1000; IF, 1:400
LC3B	Kaninchen	NB600-1384	(26)	IB, 1:4000
LC3	Ziege	sc-16756	(45)	IF, 1:200
LC3	Kaninchen	--	(*)	IF, 1:300
α -Tubulin	Maus	T9026 (DM1A)	(51)	IB, 1:4000; IF, 1:2000
β -Aktin	Maus	08691002 (C4)	(23)	IB, 1:20000
mTOR	Kaninchen	2972	(14)	IB, 1:1000
phospho-mTOR (Ser2448)	Kaninchen	2971	(14)	IB, 1:1000
Insulin R β	Kaninchen	sc-711 (C-19)	(45)	IB, 1:1000
PDI	Maus	610946 (34)	(12)	IB, 1:300; IF, 1:1000
Cytochrom c	Maus	MSA06 (37BA11)	(31)	IB, 1:4000; IF, 1:2000
GM130	Maus	610822 (35/GM130)	(12)	IB, 1:250; IF, 1:300
EEA1	Maus	610456 (14/EEA1)	(12)	IB, 1:2500; IF, 1:400
pan Cadherin	Maus	Ab6528 (CH-19)	(3)	IB, 1:1000; IF, 1:300

IB, Immunoblot; IF, Immunfluoreszenz

(*) freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Yasuo Uchiyama (Osaka Universität Medizinische Fakultät, Osaka, Japan).

Tabelle 3: Sekundärantikörper und Immunfärbereagenzien

Spezifität/Name	Spezies	Bezeichnung	Hersteller	Verdünnung
α -Maus IgG HRP-Konjugat	Kaninchen	P0161	(16)	IB, 1:3000
α -Kaninchen IgG HRP-Konjugat	Ziege	31210	(38),(51)	IB, 1:10000
α -Maus IgG AlexaFluor® 488, 546, 633	Ziege	A11029, A11030, A21052	(30)	IF, 1:400
α -Kaninchen IgG AlexaFluor® 488, 546, 633	Ziege	A11034, A11035, A21071	(30)	IF, 1:400
LysoTracker® Red DND-99		L7528	(30)	75 nM
Phalloidin AlexaFluor® 488, 568, 633		A12379, A12380, A22284	(30)	IF, 1:400

3.1.6 Bakterien und Zellen

Kompetente Bakterien (*E.coli*, DH5 α , TOP 10) (30)

Embryonale Fibroblasten aus gendefizienten Mäusen:

- A) Wildtyp, Klon 3D9
- B) $G\alpha_{i2}^{-/-}$, Klon 2G2
- C) $G\alpha_{i3}^{-/-}$, Klon 2F10
- D) $G\alpha_{i2}^{-/-}$; $G\alpha_{i3}^{-/-}$, Klon 2D7
- E) $G\alpha_{i3}^{-/-}$, Klon 3
- F) Wildtyp, Klon 3
- G) $G\alpha_{i1}^{-/-}$; $G\alpha_{i3}^{-/-}$, Klon 1

Die Mausembryonalfibroblasten A) – D) wurden von Dr. K. Spicher hergestellt.

Die Mausembryonalfibroblasten G) wurden von Anja Kletke hergestellt.

Die Isolierung der Mausembryonalfibroblasten E) und F) ist in Methoden, Kapitel 3.2.2.3 dargestellt.

3.1.7 Zellkulturmedien und Zusätze

Williams E Medium	(27)
<i>Hank Balance Salt Solution</i>	(27)
<i>Dulbecco's Phosphat Buffered Saline (D-PBS)</i>	(29)
Fötales Kälberserum (FCS), Charge: 41F1361K	(27)
Penicillin/Streptomycin (Penicillin 10 000 U/ml; Streptomycin 10 mg/ml)	(29)
Glutamin (100 x)	(29)
Fungizon (Amphotericin B; 250 µg/ml)	(27)
<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)</i>	(27)
LB-Pulvermedium	(6)
Trypsin/EDTA (0,5 % / 0,2 %)	(29)
Lipofectamin 2000	(30)
LB-Pulvermedium	(6)
LB-Agar-Pulver	(6)

3.1.8 Expressionsvektoren und Plasmide

pEGFP-LC3	von Prof. Tamotsu Yoshimori, Okazaki, Japan
-----------	---

3.1.9 Reagenzien für die Molekularbiologie

QIAquick Gel Extraction Kit	(40)
DNA-Standard 1kb (# SM0311)	(20)
Loading buffer orange (6 x)	(20)

3.1.10 Sonstige Gebrauchsartikel

Micro BCA™ Protein Assay Kit	(38)
Zellkulturmaterial	(52)
Bottle-Top-Filter, 0,2 µm	(52)
Vorgefärbter Protein-Molekulargewichtsstandard (# SM0671)	(20)
Ungefärbter Protein-Molekulargewichtsstandard (# SM0441)	(20)
Hybond C Nitrozellulose Membran	(1)
Whatman GF/B Papier	(53)

ECL Western Blotting Detection System	(38)
Röntgenfilme	(18)
Wägepapier	(24)
Ultrazentrifugationsröhrchen, 12 ml	(49)
Zellsieb, 70 µm	(9)
Filter für Viruspartikel, 45 µm	(9)
Kanüle, 20G 1 ^{1/4} (1,1 x 33 mm)	(13)
96-well-Mikrotiterplatten	(52)
Perfusionsschläuche (Heidelberger Verlängerung, Perfusor-Leitung)	(13)
Silikonschläuche für Oxygenator, Ø 3 mm Typ: 02002	(17)
22 x 22 mm Ø Glasplättchen	(33)
Objektträger	(33)
ProLong-Gold antifade	(30)

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Transformation von *Escherichia coli* mit DNA

50 µl chemisch kompetenter *E. coli*-TOP 10 Zellen (Lagerung bei -80 °C) wurden auf Eis aufgetaut und mit 1 µl pEGFP-LC3 gemischt und für 40 Minuten auf Eis inkubiert. Zum Einschleusen der DNA in die Bakterien wurde ein Hitzeschock (20 Sekunden, 42 °C) in einem Wasserbad durchgeführt. Danach wurde der Ansatz sofort für 2 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 Stunde bei 37 °C auf einem Schüttler inkubiert. Daraufhin wurde die Kultur mittels einer kurzen Zentrifugation (2000 rpm, 10 Sekunden) ankonzentriert, der Überstand abgenommen und das Pellet in 200 µl LB-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf einer LB-Agarplatte mit Zusatz geeigneter Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.1.2 Agarose-Gelelektrophorese und Elution von DNA

Zur Auftrennung von DNA nach ihrer Größe wurden 1 – 2%ige Agarosegele mit TAE als Laufpuffer benutzt. Die entsprechende Menge an Agarose wurde mit TAE erhitzt und nach dem Abkühlen mit 1 % (v/v) Ethidiumbromidlösung versetzt. Die Gel-

elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 130 V für ca. eine Stunde. Als DNA-Größenmarker wurde ein 1-kb-Marker verwendet. Nach der Auftrennung der DNA-Fragmente wurden diese mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Die gewünschten Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und die enthaltene DNA mittels dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben aus der Agarose eluiert.

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Transiente Transfektion

Zur Transfektion von Hepatozyten wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamin 2000 verwendet. Die DNA komplexiert mit den in Lipofectamin 2000 enthaltenen polykationischen Lipiden und kann aufgrund der lipophilen Eigenschaften des Reagenz in die Zelle aufgenommen werden. Am Tag der Transfektion wurden die Zellen in einer Zelldichte von ca. 4×10^5 Zellen/well in 6-well-Platten (ca. 35 mm Ø) in Medium ohne FCS und Penicillin-Zusätze ausgebracht. Dies entsprach einer Plattenkonfluenz von ca. 70 – 80 %. Für jede Multititerplatte (MTP)-Kavität wurde ein Reagenzansatz von 3 µl Lipofectamin 2000 und 250 µl Williams E Medium sowie 1 µg DNA pro 250 µl Williams E angesetzt. Beide Lösungen wurden vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Mischung wurde mit 2 ml Williams-E auf die Zellen gegeben. Nach vier Stunden Inkubation, wurde das Medium mit frischem Williams E (1 % Penicillin/Streptomycin (P/S)) versetzt.

3.2.2.2 Allgemeine Zellkultur

Mausembryonalfibroblasten (MEF) wurden in DMEM-Medium mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 7 % CO₂ und 37 °C kultiviert und etwa alle 3 - 4 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt. Die Kultivierung der Hepatozyten erfolgte in Williams E Medium, siehe 3.2.2.6. Um die Fibroblasten zu „hungern“, wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend fünf Stunden lang mit DMEM (ohne FCS, und 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 10 µg/ml Leupeptin und 10 µg/ml E64-d) inkubiert. Um Hepatozyten zu „hungern“, wurden diese ebenso dreimal mit PBS gewaschen und zwei Stunden in *Hanks Buffered Salt Solution* (HBSS) (mit 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 10 µg/ml Leupeptin und 10 µg/ml E64-d) inkubiert. Je nach Versuch wurden Insulin oder Glukagon (beide 100 nM) oder Phenylalanin (0,2 mM) für 60 Minuten in

das Medium hinzugefügt. Für Transfektionen wurden die Zellen einen Tag vorher in Petri-Schalen mit 3 oder 6 cm Durchmesser oder 6-well-Mikrotiterplatten mit 3 cm Durchmesser gegeben, so dass sie am Tag der Transfektion eine Zellkonfluenz von etwa 80 % besaßen (siehe Methoden, Kapitel 3.2.2.1). Für Immunofluoreszenz Versuche wurden 22 mm Ø Glasplättchen in 6-well-Mikrotiterplatten gelegt (siehe Kapitel 3.2.2.8).

3.2.2.3 Isolierung von embryonalen Mausfibroblasten

Zur Isolierung embryonaler Wildtyp- und $G\alpha_{i3}$ -defizienter Fibroblasten wurden $G\alpha_{i3}^{+/+}$ mit $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Mäusen verpaart. Am Tag 14 *post coital* (p.c.) wurden die Weibchen getötet und die Uteri entnommen. Die Embryonen wurden aus dem Uterus entnommen und in eine mit PBS gefüllte Kulturschale gelegt. Um ein Überwachsen der Fibroblasten-Primärkulturen mit neuronalen Zellen, Kardiomyozyten oder Leberzellen zu vermeiden, wurden den Embryonen der Kopf, Leber, Herz und wenn sichtbar die Milz entfernt. Das verbleibende Gewebe wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml 0,25 % Trypsin vier bis fünf Stunden auf Eis und im Anschluss darauf 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend wurde das verdaute Gewebe mittels einer 1000 µl-Pipettenspitze durch mehrmaliges Auf- und Abziehen in die Pipettenspitze weiter aufgeschlossen. Die Suspension wurde in eine mit DMEM (mit 10 % FCS, 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Fungizon) gefüllte 15 cm Ø Kulturschale überführt. Alle 3 - 4 Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Die Fibroblasten immortalisierten in der Regel nach ca. zwei Monaten durch spontane Transformation.

3.2.2.4 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Die Zellen wurden in der logarithmischen Phase (80 - 90 % Konfluenz) eingefroren. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und von der Zellkulturschale durch Trypsinierung mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und in Falcon-Röhrchen überführt. Nach anschließender Zentrifugation (4 min bei 100 x g, RT) wurde das Zellsediment vorsichtig in 1 - 2 ml Einfriermedium (FCS mit 10 % DMSO) resuspendiert und in ein Kryo-Schraubkappengefäß (2 ml) gefüllt. Die Zellsuspension wurde in einer Isopropanol-Einfrierbox 18 bis 24 h bei -80 °C gelagert. In dieser Einfrierbox wird durch den Isopropanol-Mantel eine langsame Herunterkühlung der Zellsuspension erreicht. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff (-196 °C) überführt und dort gelagert.

3.2.2.5 Auftauen kryokonservierter eukaryotischer Zellen

Die eingefrorenen Zellen im Kryo-Schraubkappengefäß wurden direkt vom flüssigen Stickstoff in ein 37 °C-Wasserbad überführt, aufgetaut und in Kultivierungsmedium aufgenommen und auf eine Zellkulturschale verteilt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel mit dem entsprechenden Kultivierungsmedium.

3.2.2.6 Isolierung und Kultivierung von Maushepatozyten

Alle Versuche der Maushepatozytenisolierung wurden im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II am Universitätsklinikum Düsseldorf durchgeführt und durch das Regierungspräsidium Düsseldorf genehmigt. Für die Versuche wurden männliche und weibliche Mäuse der Stämme Sv129 als auch C57BL/6 aus der Tierversuchsanlage Düsseldorf gezüchtet. Die Mäuse wurden in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf bei freiem Futter- und Wasserzugang gehalten (22 ± 2 °C; relative Luftfeuchtigkeit 55 ± 5 %; mit 12-Stunden-Lichtrhythmus). Das Alter der untersuchten Mäuse lag zwischen 8 und 12 Wochen, das Gewicht der Mäuse lag zwischen 18 und 26 Gramm. Das Protokoll für die Isolierung primärer muriner Hepatozyten erfolgte nach einem Protokoll von Markus Mroz (mündliche Kommunikation; Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) und Seglen (Seglen, 1976), das modifiziert wurde (siehe Methoden, Kapitel 3.2.2.6.4 und Ergebnisse, Kapitel 4.1.1).

3.2.2.6.1 Versuchsaufbau für die Hepatozytenisolierung

Das System besteht aus einem Wasserbad mit einem regelbaren Thermostaten, einer peristaltischen Pumpe, einem Oxigenator (Plexiglas® Zylinder: 90 mm x 120 mm mit 14 Windungen Ø 80 mm; Silikonschläuche Ø 3 mm) und einem Blasenfänger (eigene Konstruktion). Für die Ausleuchtung des Arbeitsbereiches wurde eine Kaltlichtlampe verwendet.

3.2.2.6.2 Herstellung des Perfusates

Die Lösungen wurden unmittelbar vor der Versuchsdurchführung frisch angesetzt und mittels eines Flaschenaufsatzfilters (0,2 µm Porengröße) in autoklavierte Laborglasflaschen sterilfiltriert.

Krebs-Henseleit-Puffer (KHP): 0,01 M HEPES; 25 mM NaHCO₃; 115 mM NaCl; 5,9 mM KCl; 1,2 mM MgCl₂ x 6 H₂O; 1,2 mM NaH₂PO₄ x 1 H₂O; 1,2 mM Na₂SO₄; 1,25 mM CaCl₂ x 2 H₂O; 6 mM Glukose; pH 7,5.

Ca²⁺/SO₄²⁻-freier Perfusionspuffer: 0,01 M HEPES; 25 mM NaHCO₃; 115 mM NaCl; 5,9 mM KCl; 1,2 mM MgCl₂ x 6 H₂O; 1,2 mM NaH₂PO₄ x H₂O; 6 mM Glukose; pH 7,6.

Kollagenase-Lösung: 100 ml Ca²⁺/SO₄²⁻-freier Perfusionspuffer; 6 mM CaCl₂ x 2 H₂O; 2 g Rinderserumalbumin; 33 mg Kollagenase; pH 7,6.

3.2.2.6.3 Beschichtung von Kulturschalen mit Kollagen

Rattenschwanz-Kollagen, Kollagen R (Typ I), wurde mit sterilem PBS auf die finale Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. Zum Beschichten einer 10 cm Ø Petrischale (Material: Polystyrol) wurden jeweils 5 ml dieser Lösung verwendet, und die Petrischalen wurden zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurde die Kollagen-Lösung abgenommen und die Schalen in der Laminar-Flow Arbeitsbank mit offenen Deckeln getrocknet.

3.2.2.6.4 Isolierung der murinen Hepatozyten

Die Mäuse wurden mit einem Gemisch aus 5 mg/kg Körpergewicht Xylazin (Rompun, Bayer Vital, Deutschland) und 20 mg/kg Körpergewicht Ketaminhydrochlorid (Ketavet, Pfizer, USA) tief betäubt. Das Betäubungsgemisch wurde intraperitoneal (linker abdominaler Quadrant) injiziert. Nach eingetretener Anästhesie (kein Zehenreflex) wurde die Maus auf der Präparationsplattform fixiert. Der Perfusionsfluss wurde auf 1,5 bis 2,0 ml/min eingestellt. Anschließend wurde nahe der Genitalöffnung ein abdominaler Schnitt durchgeführt. Die entstandene Öffnung wurde durch weitere Schnitte entlang der Rippenbögen und im abdominalen Bereich erweitert. Die Bauchdecke konnte danach seitlich umgeklappt werden. Die nun freiliegenden Eingeweide wurden rechts zur Seite gelegt, ohne sie dabei zu verletzen. Durch das Beiseiteschieben der Eingeweide mit den Darmschlingen wurde die *vena cava caudalis* (hintere untere Hohlvene), an der rechten Niere, sowie die *vena portae* (Pfortader) freigelegt. Kaudal vom Zwerchfell liegt die braunrote Leber. Um die *vena cava caudalis* wurde unterhalb der Leber, aber oberhalb der rechten Niere mit festem Operationsgarn (Stärke 10) ein loser Knoten (Ligatur) gelegt (siehe Abbildung 8). Danach wurde eine weitere Ligatur locker um die Pfortader gelegt. Mit einer Augenschere wurde distal zur gelegten Ligatur eine kleine Öffnung in die Pfortader geschnitten, durch die eine Kanüle (20G 1^{1/4}) gesetzt und sofort fixiert wurde. Über die Perfusionsschläuche wurde das Perfusat (Ca²⁺/SO₄²⁻-freier Perfusionspuffer) in die Leber geleitet.

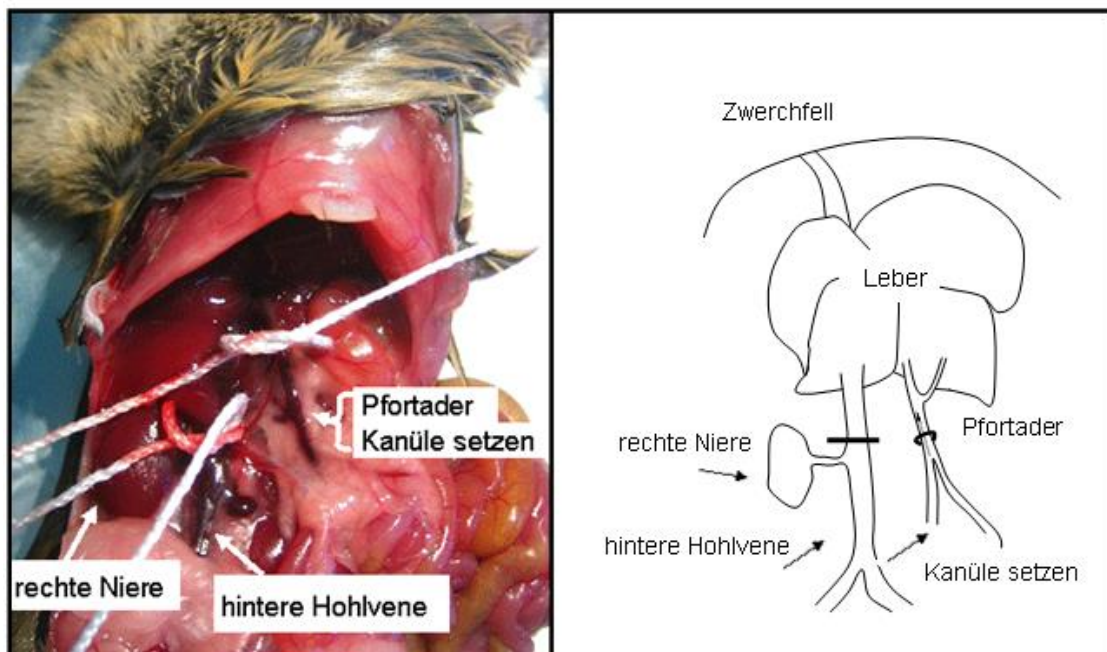


Abbildung 8. Darstellung der Operationstechnik

Die narkotisierte Maus wurde mit einem median verlaufenden Schnitt geöffnet und die *vena portae* (Pfortader) freigelegt. Durch das Legen einer Kanüle in die Pfortader wird die Leber perfundiert. Siehe Text für eine ausführliche Beschreibung.

Unmittelbar nach dem Fixieren der Kanüle und dem Beginn der Perfusion wurde der Brustkorb aufgeschnitten und der rechte Herzvorhof angeschnitten, um das Abfließen des Perfusates zu gewähren. Dies war nötig, um den unter den Perfusionsbedingungen rasch aufbauenden Druck in der Leber zu erniedrigen und eine Schädigung der Leberzellen zu verhindern. Erst dieser letzte Arbeitsschritt verursachte den Tod der Maus. Unmittelbar nach diesem Schritt wurde die Flussrate auf 6 - 7 ml/Minute erhöht. Das Perfusat durchströmte die Leber, die sich mit zunehmender Perfusionsdauer und dem damit verbundenen Austausch des Blutes gegen das Perfusat farblich aufhellte (gelbbraun). Die Leber wurde zuerst sieben bis acht Minuten mit $\text{Ca}^{2+}/\text{SO}_4^{2-}$ -freiem Perfusionspuffer perfundiert, um das Blut aus der Leber zu entfernen, und anschließend sieben bis neun Minuten mit der Kollagenaselösung perfundiert, um die extrazelluläre Matrix der Leber zu verdauen und somit die Hepatozyten aus dem Zellverband zu lösen.

3.2.2.6.5 Freisetzung der Leberzellen und Reinigung der Hepatozyten

Nach Beendigung des Perfusionzuflusses wurde die Kanüle entfernt. Anschließend wurde die Leber vorsichtig aus dem Körper präpariert und in eine mit Krebs-Henseleit-Puffer gefüllte Petrischale überführt. Die Gallenblase sowie restliches, leberfremdes Gewebe wurden entfernt. Mit stumpfen Pinzetten wurden die Le-

berkapseln geöffnet. Dabei werden die Hepatozyten und ein Großteil der Nichtparenchymzellen freigesetzt. Das restliche, fibröse Lebergewebe wurde mittels Filtration der Zellsuspension durch Gaze-Kompressen entfernt. Aus einem ca. 2 g schweren Organ können ca. 1 bis $1,5 \times 10^6$ Zellen gewonnen werden. Zur Bestimmung der Zellvitalität wird aus der Zellsuspension eine Probe in eine 0,5%ige Trypanblaulösung gegeben. Nach etwa drei Minuten Inkubation kann die Gesamtzellzahl und die Vitalitätsrate mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ermittelt werden (dunkelblau gefärbte Zellen sind geschädigt). Mit dem beschriebenen Isolationsprotokoll erreicht man reproduzierbar eine Vitalität von 80 - 90 %. Die Leberzellen wurden durch zweimaliges Zentrifugieren ($19 \times g$, 2 min, mit maximaler Beschleunigung und ohne Bremse bei 4°C) aufgereinigt. Die intakten Hepatozyten setzten sich aufgrund ihrer höheren Dichte als lockeren Bodensatz ab. Der Überstand beinhaltete Endothelzellen sowie geschädigte Hepatozyten. Als letzter Aufreinigungsschritt erfolgte eine Filtrierung der Zellsuspension durch ein $70 \mu\text{m}$ -Nylon-Maschensieb und eine erneute Zentrifugation ($19 \times g$, 2 min, mit maximaler Beschleunigung und ohne Bremse bei 4°C).

3.2.2.6.6 Monolayerkultivierung von Hepatozyten

Hepatozyten adhärieren nur sehr schlecht an die gängigen Zellkulturschalenoberflächen, die meist aus Polystyrol bestehen. Doch das Anheften an ein Substrat und die damit verbundenen Änderungen in der Zellform und der Organisation des Zytoskeletts besitzen einen großen Einfluß auf die Proteinsynthese und den Erhalt leberspezifischer Funktionen. Die effektive Adhäsion von isolierten Leberzellen an festen Matrices hängt nicht nur von der Oberflächencharakteristik der Kulturschalen ab, sondern auch vom Kulturmedium und von Kultivierungsbedingungen, wie z. B. der Begasung, ab. Für die Aufrechterhaltung differenzierter Funktionen von kultivierten Hepatozyten hat sich Williams E Medium bewährt, welches von Williams und Gunn insbesondere für die Bedürfnisse von adulten Hepatozyten in Langzeitkultivierung angepasst worden ist (van 't Klooster *et al.*, 1994, Williams & Gunn, 1974).

Die Hepatozyten-angereicherte Suspension wurde in die mit Kollagen beschichteten Kulturschalen (2×10^5 Zellen/10 cm-Schale) verteilt. Zur Equilibration der Hepatozyten wurden diese drei Stunden im Krebs-Henseleit-Puffer inkubiert. Nach drei Stunden wurden die nicht-adhärerten Zellen mittels eines Medienwechsels mit Williams E (1 % Penicillin/Streptomycin) entfernt. Die Kultivierung der Hepatozyten erfolgte in

Williams E Medium (1 % Penicillin/Streptomycin) bei 37 °C unter Carbogenatmosphäre (95 % O₂/5 % CO₂). Das Medium enthielt keine weiteren Zusätze. Auf den Zusatz von Serum wurde verzichtet, um eine Überwucherung der Hepatozyten von eventuell noch in der Kultur befindlichen Fibroblasten zu vermeiden.

Hepatozyten heften sich gut an alle Sorten von Kollagen. Es bildet einen gelartigen Film, auf denen sich Hepatozyten schnell und am Anfang mit wenig abgeflachter Form anheften (Abbildung 9A). Nach etwa 6 - 24 Stunden begannen die Hepatozyten abzuflachen und nahmen eine kubische Form an (Abbildung 9B und C) die nach 48 h und 72 h in eine eher hexagonale Form überging (Abbildung 9D und E). Abgestorbene Zellen sedimentierten auf den unbeschädigten Hepatozyten (siehe Abbildung 9B, siehe Pfeile) und wurden nach einem Medienwechsel entfernt. Alle 2 – 3 Tage erfolgte ein Medienwechsel. Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation endogener Proteine bzw. zur Induktion der Autophagie wurden in der vorliegenden Arbeit Hepatozyten in HBSS unter Nährstoff-armen Bedingungen (Hungerung) kultiviert (siehe Kapitel 3.2.2.2). Die Kultivierungszeit im Vorfeld zu den entsprechenden Versuchen betrug 48 - 72 Stunden.

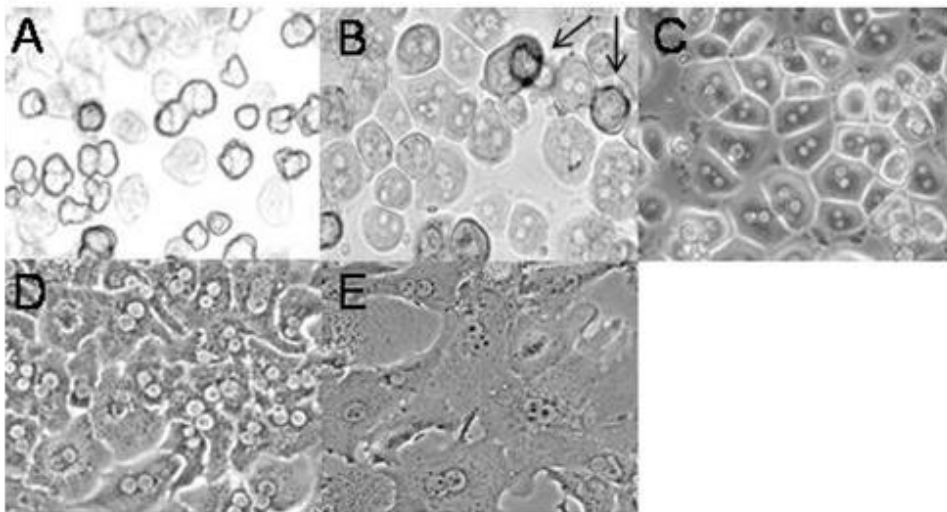


Abbildung 9. Monolayerkultur von Hepatozyten

Gezeigt sind isolierte Hepatozyten in Kultur. Hepatozyten in Krebs-Henseleit-Puffer wenige Minuten nach der Isolierung (A). Hepatozyten in Williams E Medium nach sechs Stunden (B), nach 24 Stunden (C), nach 48 Stunden (D) und nach 72 Stunden (E) in Kultur. Dargestellt sind repräsentative Phasenkontrast-Aufnahmen (40-fache Vergrößerung).

3.2.2.7 Immunfluoreszenz

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation endogener Proteine wurden in der vorliegenden Arbeit MEFs und Hepatozyten auf Glasplättchen (5×10^4 -Zellen/0,22

cm-Plättchen) ausplattiert und entweder in DMEM ohne FCS (MEFs) oder in HBSS (Hepatozyten) gehungert oder unter Nährstoff-reichen Bedingungen kultiviert (siehe 3.2.2.2). Um Lyosomen bzw. Autolysomen sichtbar zu machen, wurde in den letzten 30 Minuten vor der Fixierung der Zellen 75 nM LysoTracker Red in das Inkubationsmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden, je nach dem welche Antikörper verwendet wurden, entweder für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) mit 4 % Paraformaldehyd oder mit Aceton für zehn Minuten bei -20 °C fixiert und anschließend zehn Minuten bei 4 °C mit dem Detergenz Triton X-100 (0,5 % Triton X-100 in PBS) permeabilisiert. Die fixierten Zellen wurden 2 x mit kaltem PBS gewaschen und freie, unspezifische Bindungsstellen in den Zellen wurden für eine Stunde bei RT (oder über Nacht bei 4 °C) mit 3 % BSA blockiert. Die Zellen wurden eine Stunde bei RT mit verdünntem Primärantikörper in 1 % BSA (siehe Tabelle 2) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und für eine Stunde bei RT mit verdünntem Sekundärantikörper in 1 % BSA (siehe Tabelle 3) inkubiert. Nach einem erneuten Waschvorgang wurden die Zellen zehn Minuten lang mit DAPI (1:3000 Verdünnung in 1 % BSA einer 5 mg/ml Stammlösung) inkubiert. Abschließend wurden die Glasplättchen auf Objektträger in *ProLong antifade Gold* Eindecksubstanz eingebettet und am Konfokalmikroskop ausgewertet.

3.2.2.8 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Die subzelluläre Lokalisation der fluoreszenz-markierten endogenen Proteine wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop untersucht. Für die kLSM wird ein Laserstrahl auf einen kleinen Objektbereich fokussiert, das zurückkommende Streulicht separiert und nach Durchquerung einer Lochblende (*pinhole*) detektiert. Das Pinhole verhindert die Detektion von Photonen die nicht aus der Fokusebene stammen, weshalb die Fläche des beleuchteten Bereiches der Fläche des detektierten Lichtfleckes entspricht („konfokales“ Prinzip). Die Punkt-zu-Punkt-Abbildung ermöglicht, dass Probenbereiche auf der optischen Achse, vor und hinter dem Fokus nicht zum Signal beitragen und liefert somit optische Schnitte einer Ebene. Die Aneinanderreihung solcher Bilder (z. B. aus sukzessiver Verschiebung der Tiefenrichtung) liefert ein tiefenscharfes Bild (Pawley, 2006). Die fixierten und fluoreszenz-markierten Zellen wurden mittels eines Argon-Lasers und des HeliumNeon2(HeNe2)-Lasers mit den Wellenlängen 488 nm und 633 nm nacheinander getrennt angeregt. Das Fluoreszenzlicht wurde mit Hilfe des UV/488/543/633 nm Hauptfarbteilers, sowie dem 505-

530 nm Bandpassfilter bzw. 650 nm Langpassfilter detektiert. Die konfokalen Blenden wurden so eingestellt, dass die optischen Schichtdicken zwischen 0,5 und 1,0 μm lagen.

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Herstellung von Zell-Lysaten

Zur Gewinnung von Gesamtzell-Lysaten z. B. aus Hepatozyten oder murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) wurden die adhärennten Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in eiskaltem Lysepuffer aus 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 1 % SDS, 1 % Triton X-100, 10 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin, 10 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin A, 0,1 μM Calyculin, 200 μM Vanadat, 10 $\mu\text{g/ml}$ E64-d und einer Protease-Inhibitor-Cocktail-Tablette pro 50 ml Flüssigkeit gelöst. Nach mechanischer Ablösung der Zellen wurden diese in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Der Zellaufschluß erfolgte bei 4 °C durch 10-maliges Aufziehen durch eine 26-gauge-Kanüle. Die Lysate wurden im Kühlraum bei 4 °C 30 Minuten auf einem Taumelschüttler inkubiert. Der partikuläre Anteil wurde bei 13000 rpm von der Suspension abgetrennt. Aliquots dieser Zelllysate wurden für die Proteinbestimmung entnommen (siehe 3.2.3.2).

3.2.3.2 Proteinbestimmung

Die Protein-Konzentration von Zell- oder Gewebslysaten wurde mittels der BCA-Methode (BCA Protein Assay, Thermo Fisher Scientific) im 96-well Mikrotiterplatten-Format ermittelt. Bicinchoninsäure (BCA) ist ein für Kupferionen hochspezifisches Reagenz (Smith et al., 1985; Wiechelman et al. 1988). In einer der Biuret-Reaktion ähnlichen Reaktion (Lowry, 1951) reduzieren Proteine im alkalischen Medium zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) zu einwertigen Kupferionen (Cu^+), die zusammen mit Bicinchoninsäure einen farbigen Kupfer-Bicinchoninsäurekomplex bilden (Abbildung 10). Die Konzentration dieses Komplexes ist proportional zum Proteingehalt der Probe, und kann bei einer Wellenlänge von 562 nm spektrophotometrisch vermessen werden. Die Quantifizierung des Protein-Gehalts in den Lysaten erfolgte über die Erstellung einer Kalibriergeraden mit bekannten Albumin-Konzentrationen, welche in jedem Versuch parallel zu den Testproben analysiert wurde.

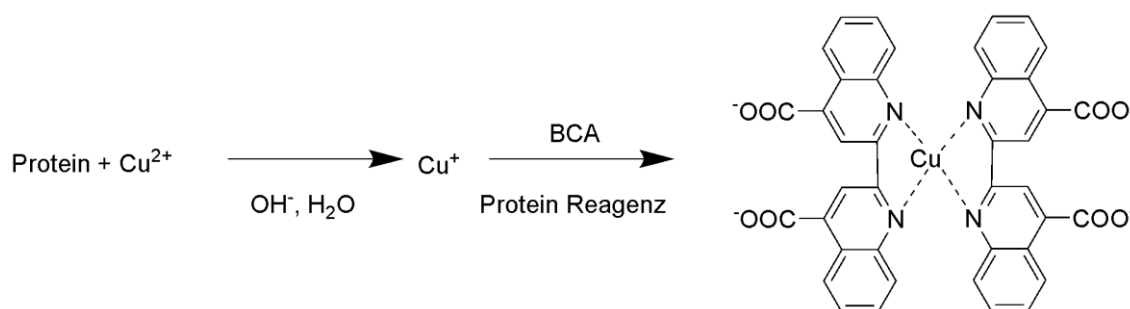


Abbildung 10. Reaktionsprinzip der Proteinbestimmung nach der BCA-Methode

3.2.3.3 Generierung $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -spezifischer Antikörper

$G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -gerichtete, polyklonale Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen mit Peptiden generiert, die dem extremen C-Terminus dieser beiden $G\alpha_i$ -Proteine entsprechen (siehe Tabelle 4).

Die Auswahl basierte auf den Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe mit früher erzeugten Antikörpern (Nürnberg *et al.*, 1994, Valenti *et al.*, 1998). Hierzu wurden die 14 C-terminalen Aminosäuren des $G\alpha_{i2}$ - bzw. $G\alpha_{i3}$ -Proteins als Peptide synthetisiert. Dies erfolgte bei der Firma Squarix GmbH in Marl. Diese Sequenzen sind in den jeweiligen humanen und murinen $G\alpha_{i2}$ - bzw. $G\alpha_{i3}$ -Proteinen identisch. Die C-terminale Sequenz des humanen/murinen $G\alpha_{i2}$ (...³⁴¹DVIKNNLKDCGLF³⁵⁴) unterscheidet sich nur durch zwei Aminosäuren (unterstrichen) von der korrespondierenden C-terminalen Sequenz des humanen/murinen $G\alpha_{i3}$ (...³⁴¹DVIKNNLKECGLY³⁵⁴) (siehe auch Abbildung 33).

Um eine Kopplung an das *keyhole limpet hemocyanin* (KLH)-Protein zu ermöglichen, wurde bei beiden Peptiden zusätzlich ein N-terminales Cystein eingefügt. KLH ist ein hochmolekulares Protein, das in Kaninchen eine starke Immunantwort hervorruft, und welches daher häufig als Adjuvans bei der Generierung von Peptidantikörpern verwendet wird. Das interne Cystein der $G\alpha_{i2}$ - bzw. $G\alpha_{i3}$ -Peptide (entsprechend der Aminosäure 351 in $G\alpha_{i2}$ bzw. $G\alpha_{i3}$) wurde jeweils durch die isosterische α -Aminobuttersäure ersetzt, um eine intramolekulare Disulfidbrücken-Bildung mit dem N-terminal eingefügten Cystein (Cystin-Bildung) zu verhindern. Die Peptidsynthese erfolgte ebenfalls durch die Firma Squarix, Marl.

Die Immunisierung von jeweils zwei weiblichen *specific pathogen-free* (SPF)-Kaninchen (*New Zealand White rabbits*) mit den $G\alpha_{i2}$ - bzw. $G\alpha_{i3}$ -Peptiden wurde von der Firma Charles River, Kisslegg, durchgeführt. Hierbei wurde in einem 70-Tage Protokoll jedes Kaninchen viermal immunisiert. Der Serumtiter im Prä-Immunserum sowie

in der ersten und zweiten Testblutung wurde mittels *enzyme-linked immunosorbent assays* (ELISAs) bestimmt.

$G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -monospezifische Antikörper wurden durch die Firma Squarix mittels Immunaффinitätsisolierung aufgereinigt. Hierzu wurden zunächst die Immunglobuline der IgG-Fraktion mittels Ammoniumsulfat gefällt. $G\alpha_{i2}$ - bzw. $G\alpha_{i3}$ -gerichtete IgGs wurden dann an den jeweiligen immobilisierten Peptiden mittels *fast protein liquid chromatography* (FPLC) affinitätschromatographisch aufgereinigt, und es wurden drei sequentielle Eluate mit unterschiedlich hoher Affinität zu den immobilisierten Peptiden gewonnen (Eluat A, B, C), wobei die am spätesten eluierte Fraktion (Eluat C) die höchste Affinität zu dem immobilisierten Peptid aufwies. In einem letzten Schritt wurden Antikörper-Aggregate durch Gelausschluß-Chromatographie an einer Superdex 200 HR 10/30 Säule entfernt.

Tabelle 4: Vergleich der C-terminalen Aminosäuresequenzen der $G\alpha_i$ -Familienmitglieder

$G\alpha_i$ -Protein	C-terminale Aminosäuresequenz
$G\alpha_{t(r,c)}$	³⁴¹ DI I I KENLKD CGLF ³⁵⁴
$G\alpha_{gust}$	³⁴¹ DI I I KENLKD CGLF ³⁵⁴
$G\alpha_{i1}, G\alpha_{i2}$	³⁴¹ DV I I KNNLKD CGLF ³⁵⁴
$G\alpha_{i3}$	³⁴¹ DV I I KNNLKE CGLY ³⁵⁴
$G\alpha_{o1,o2,o3}$	³⁴¹ DV I I AKNLRG CGLY ³⁵⁴
$G\alpha_z$	³⁴¹ DV I I QNNLKY IGLC ³⁵⁴

Abkürzungen: $G\alpha_{t(r)}$ und $G\alpha_{t(c)}$, Transduzine in Stäbchen- (*rods*) und Zapfenzellen (*cones*) der Retina; $G\alpha_{gust}$, Gustduzin; $G\alpha_{i1-3}$, inhibitorische G-Protein α -Untereinheiten, Isoformen 1-3; $G\alpha_o$, G-Protein α -Untereinheiten, Isoformen 1-3; $G\alpha_z$, Pertussis Toxin-insensitives $G\alpha$ -Protein, das durch das GNAZ-Gen kodiert wird.

Präadsorption von Antikörpern

Um mögliche unspezifische Interaktionen der $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -gerichteten, affinitätsgereinigten Antikörper (Eluat C) weiter zu reduzieren, wurde ein zusätzlicher Präadsorptionsschritt eingefügt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der $G\alpha_{i3}$ -Antikörper hauptsächlich für die subzelluläre Analyse der $G\alpha_{i3}$ -Lokalisation in Hepatozyten verwendet. Daher wurde der Antikörper an $G\alpha_{i3}$ -defizientem Leber-Acetonpuder präadsorbiert. Der $G\alpha_{i2}$ -Antikörper wurde vorwiegend für die subzelluläre Analyse der

$G\alpha_{i2}$ -Lokalisation in Mausembryonalfibroblasten eingesetzt, und daher an Acetonpuder aus $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mausembryonen präadsorbiert.

Die Herstellung des jeweiligen Acetonpuders erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Harlow und Lane (Harlow & Lane, 1999). Die Lebern von zwei $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen bzw. $G\alpha_{i2}$ -defizienten Mäusembryonen wurden in Flüssigstickstoff schockgefroren und in einem Mörser unter ständiger Kühlung fein homogenisiert, um eine Zellsuspension herstellen zu können (1 g Lebergewicht/ml 0,9 % NaCl-Lösung). Das erhaltene Homogenat wurde ohne Agitation für weitere fünf Minuten in einem Eiswasserbad gekühlt, und dann mit 8 ml vorgekühltem Aceton (-20 °C) pro 2 ml Homogenat versetzt. Diese Mischung wurde für 30 Minuten im Kühlraum (4 °C) unter gelegentlichem Vortexen inkubiert. Durch Aceton wurden Lipide entfernt und die Zellen dehydratisiert, so dass die Proteine präzipitieren. Die präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation (10000 x g, 4 °C, zehn Minuten) pelletiert, und der Überstand wurde verworfen. Dieser Entwässerungs- und Entfettungsschritt wurde noch 2 x wiederholt. Anschließend wurde das Pellet auf trockenes Filterpapier ausgebracht und zum Trocknen mit einem Spatel dünn auf dem Papier verteilt. Der Acetonpuder wurde bei -20 °C gelagert. Zur Präadsorption der Antikörperlösungen wurden diese 30 Minuten bei 4 °C mit 1 % (w/v) des jeweiligen Acetonpuders in einem Überkopfschüttler inkubiert. Unlösliche Bestandteile wurden durch Zentrifugation (10000 x g, 4 °C, 10 Minuten) pelletiert, und die präadsorbierten Antikörper im Überstand wurden in den in Tabelle 2 angegebenen Verdünnungen für Versuche eingesetzt.

Peptidneutralisation des $G\alpha_{i3}$ -Antikörpers

Zur Charakterisierung der Spezifität des $G\alpha_{i3}$ -Antikörpers wurde ein Peptidneutralisationsversuch durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.2). Dazu wurde 1 µg des $G\alpha_{i3}$ -Antikörpers mit 5 µg des $G\alpha_{i3}$ -Peptides in 500 µl PBS aufgenommen und fünf Stunden lang bei 4 °C in einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach der Zentrifugation (10000 x g, 4 °C, zwei Minuten) wurde der Überstand in der gleichen Verdünnung wie der $G\alpha_{i3}$ -Antikörper eingesetzt (Tabelle 2).

3.2.3.4 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer relativen molekularen Masse wurde ein denaturierendes, diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE)-System verwendet (nach Laemmli, 1970). Je Probe wurden 30 – 40 µg der

lysierten Zellen- oder Gewebeproben (siehe Kapitel 3.2.3.1) mit dem vierfach-konzentrierten SDS-Laemmli-Puffer versetzt (250 mM Tris-HCl, pH 6,8; 40 % Glycerol, 20 % β -Mercaptoethanol, 4 % SDS, 0,08 % Bromphenolblau), so dass eine einfache Konzentration entstand. Die Proben wurden durch Erhitzen (95 °C, 5 min) weiter denaturiert und anschließend auf geeignete Gele aufgetragen. Für die diskontinuierliche SDS-PAGE wurden zur Konzentrierung der Proteine in der Regel 3%ige Sammelgele und zur Auftrennung der Proteine abhängig von deren molekularer Masse 7,5-, 10- oder 15-prozentige Trenngele verwendet (7,5 × 10 × 0,1 cm, Tabelle 6). Zur Auftrennung der $G\alpha_i$ -Isoformen $G\alpha_{i1}$, $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ wurden Polyacrylamid-SDS-Harnstoffgele (16 x 18 cm, Tabelle 7) benutzt (Codina *et al.*, 1991, Ribeiro-Neto & Rodbell, 1989, Towbin *et al.*, 1979). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wurde in Laufpuffer (Tabelle 5) bei 80 - 150 V konstanter Spannung mit Hilfe des *Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis Systems* durchgeführt (BioRad Laboratories GmbH, München).

Tabelle 5: Puffer für die SDS-PAGE

Puffer	Zusammensetzung
Sammelgelpuffer für SDS-Gele	250 mM Tris/HCl, pH 6,8 + 0,2 % SDS
Trenngelpuffer für SDS-Gele	750 mM Tris/HCl, pH 8,8 + 0,2 % SDS
Sammelgelpuffer für SDS-Urea-Gele	125 mM Tris/HCl, pH 6,8 + 0,1 % SDS
Trenngelpuffer für SDS-Urea-Gele	3 M Tris/HCl, pH 8,8 + 0,8 % SDS
Laufpuffer	25 mM Tris-Base, pH 8,3 + 192 mM Glycin, 1,0 % (w/v) SDS

Tabelle 6: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Angaben für ein 7,5 x 10 cm Gel	SAMMELGEL	TRENNGEL 7,5 %	TRENNGEL 10 %	TRENNGEL 15 %
Acrylamid/Bis-acrylamid (30 %)	0,5 ml	1,5 ml	2 ml	3 ml
Sammelgelpuffer	1,5 ml	---	---	---
Trenngelpuffer	---	3 ml	3 ml	3 ml
H ₂ O	1,0 ml	1,5 ml	1 ml	---
12,5 % APS	20 μ l	45 μ l	45 μ l	45 μ l
TEMED	10 μ l	15 μ l	15 μ l	15 μ l

Tabelle 7: Zusammensetzung der Harnstoffgele

Angaben für ein 16 x 18 cm Gel	SAMMELGEL	HARNSTOFF-TRENNGEL (6 M Urea, 9 % Acrylamid)
Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	1,0 ml	---
Acrylamid/Bisacrylamid (40 %)	---	9 ml
Sammelgelpuffer	3,0 ml	---
Trenngelpuffer	---	5 ml
H ₂ O	2,0 ml	25,7 ml
12,5 % APS	40 µl	100 µl
TEMED	20 µl	10 µl
Harnstoff	---	14,4 g

Immunoblot-Analyse

Der Transfer (*Blotten*) der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose-Membranen (Hybond C extra) (Towbin *et al.*, 1979) erfolgte mittels des *Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell Systems* (Bio-Rad Laboratories GmbH; Towbin *et al.*, 1992).

Die Nitrozellulose-Membran, sowie sechs Lagen *Whatman*-Filterpapier wurden exakt auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Das Gel wurde in einem *sandwich* aus Filterpapieren luftblasenfrei mit der Nitrozellulose-Membran in Kontakt gebracht. Dazu wurden zwei Lagen Transferpapier in Anodenpuffer I (für die unterschiedlichen Pufferzusammensetzungen in Abhängigkeit vom Molekulargewicht der zu transferierenden Proteine siehe Tabelle 8) getränkt und auf der Anode plziert, ein drittes mit Anodenpuffer II getränktes Filterpapier wurde darüber gelegt. Die Nitrozellulose-Membran wurde mit Anodenpuffer II benetzt, bevor sie auf die Filterpapiere aufgelegt wurde. Das Gel wurde fünf Minuten in Kathodenpuffer äquilibriert und dann auf die Nitrozellulose-Membran positioniert. Der Kontakt zur Kathode wurde durch drei Lagen in Kathodenpuffer äquilibriertem Filterpapier hergestellt. Der Transfer dauerte je nach Molekulargewicht der zu transferierenden Proteine 30 – 90 Minuten bei einer verwendeten Stromstärke von 1,45 mA x Gelgröße (cm²).

Nach Beendigung des Blottens wurden die transferierten Proteine auf der Nitrozellulose-Membran mit Ponceau S-Lösung reversibel angefärbt und der ungebundene Farbstoff durch Spülen mit demineralisiertem H₂O entfernt. Die gefärbten

Membranen wurden zu Dokumentationszwecken kopiert oder eingescannt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 1 h bei RT in Blockierungspuffer inkubiert. Die Immunodetektion erfolgte durch Übernacht-Inkubation bei 4 °C mit den jeweiligen primären Antikörpern, die in Antikörper-Verdünnungslösung (siehe Tabelle 8) angesetzt wurden. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Die Nitrozellulose-Membran wurde dann 2 x für zehn Minuten in TBS-T gewaschen, und für eine Stunde bei RT mit einem Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper (anti-Maus- bzw. anti-Kaninchen-IgG, 1:3000 bzw. 1:10000 verdünnt in Blockierungspuffer) inkubiert. Alle Inkubations- und Wasch-Schritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt. Die Nitrozellulose-Membran wurde dann erneut 2 x für zehn Minuten in TBS-T gewaschen. Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe wurde die Peroxidase-Aktivität durch verstärkte Chemilumineszenz (*enhanced chemiluminescence*, ECL) nachgewiesen. Dazu wurde die Membran für zwei Minuten mit dem ECL-Reagenz (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Thermo Fisher Scientific) benetzt und zur Belichtung auf Photofilme aufgelegt. Die Detektion der primären Antikörper mit Hilfe von Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörpern mittels Chemolumineszenz kann mehrfach durchgeführt werden, d.h. man kann die an der Membran gebundenen Antikörper wieder entfernen (*strippen*; (Exner & Nürnberg, 1998) und die auf der Membran immobilisierten Proteine erneut mit anderen Antikörpern analysieren. Hierzu wurde die Membran für 30 Minuten in *stripping*-Puffer bei 57 °C inkubiert und anschließend mehrmals mit einem großen Volumen TBS-T gewaschen. Danach wurde die Membran wie oben beschrieben erneut in Blockierungslösung abgesättigt, über Nacht mit primärem Antikörper inkubiert und über Bindung des sekundären Antikörpers wie beschrieben analysiert.

Tabelle 8: Puffer für die Immunoblot-Analyse

Name	Zusammensetzung
Transferpuffer (Proteine \leq 40 kDa)	
Kathodenpuffer	25 mM Tris, pH 9,4; 40 mM Glycin, 10 % Methanol
Anodenpuffer I	0,3 M Tris, pH 10,4; 40 % Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris, pH 10,4; 40 % Methanol

Name	Zusammensetzung
Transferpuffer (Proteine ≥ 40 kDa)	
Kathodenpuffer	25 mM Tris, pH 9,4; 40 mM Glycin, 10 % Methanol, 0,005 % SDS
Anodenpuffer I	0,3 M Tris, pH 10,4; 20 % Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris, pH 10,4; 20 % Methanol
Ponceau S-Lösung	0,2 % Ponceau S in 3 % Trichloressigsäure
Blockierungspuffer ("BLOTTO")	0,05 M Tris, pH 8, 2 mM CaCl_2 , 0,08 M NaCl, 5 % Magermilchpulver, 0,2 % NP-40
Antikörper-Verdünnungslösung	10 mM Hepes pH 7,4, 0,5 M NaCl, 1 % BSA, 0,2 % Tween 20, 0,02 % NaN_3
TBST-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) Tween 20
<i>stripping</i> -Puffer	62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 0,7 % (v/v) β -Mercaptoethanol

3.2.3.5 Isolierung von Autophagosomen

Die Isolierung der Autophagosomen aus Maushepatozyten oder aus Mausembryonalfibroblasten (MEF) erfolgte in modifizierter Form nach der Methode von Stromhaug und Seglen (Stromhaug *et al.*, 1998). Sämtliche Isolierungs-Schritte wurden bei 4 °C im Kühlraum bzw. wenn angegeben in einem Eisbad durchgeführt. Alle Puffer enthielten Protease-Inhibitoren (Protease Inhibitor Cocktail, Roche Diagnostics), und wurden eiskalt verwendet. In zehn 15 cm Ø Kulturschalen wurden Mausembryonalfibroblasten bis zur Konfluenz im Brutschrank kultiviert bzw. die Hepatozyten mit einer Zelldichte von ca. 2×10^6 Zellen pro 15 cm Ø Kulturschale ausgesät. Um die Autophagosomen zu akkumulieren wurden die Zellen (MEFs in DMEM ohne FCS; Hepatozyten in HBSS) mit 50 μM Vinblastin für zwei Stunden bei 37 °C und 20 μM Leupeptin inkubiert. Hierbei verhindert Leupeptin den letzten Schritt in der Autophagie – den Abbau des Autolysosoms, das ein fusioniertes Autophagosom mit einem Lysosom darstellt, indem es die lysosomalen Membranpermeasen inhibiert. Vinblastin, ein Vincaalkaloid bindet an das Protein Tubulin und hemmt so die Ausbildung von Mikrotubuli, was die Fusion von Autophagosomen mit endosomalen und lysosomalen Kompartimenten verhindert (Fengsrud *et al.*, 1995, Kovacs *et al.*, 1982, Seglen & Brinchmann, 2010). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit dem

Homogenisationspuffer HB (0,25 M Saccharose, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 7,3) gewaschen und von den Kulturschalen abgeschabt. Die Zellsuspensionen (ca. 30 ml) aller zehn Platten wurden fünf Sekunden mit dem Ultrathurax aufgeschlossen und anschließend mit dem Dounce-Homogenisator weiterhin schonend homogenisiert (15 Schläge).

Um Autophagosomen gezielt von den vergleichbar dichten Lysosomen trennen zu können, wurde das Homogenat mit Glycin-Phenyl- β -Naphthylamid (GPN), einem Cathepsin C-Substrat behandelt, um ein osmotisches Aufquellen und Zerreißen der Lysosomen zu erreichen (Jadot *et al.*, 1984, Seglen & Brinchmann, 2010, Stromhaug *et al.*, 1998). Hierbei wurde das Zellhomogenat genau sechs Minuten bei 37 °C mit 0,5 mM Glycin-Phenyl- β -naphthylamid (GPN) inkubiert und anschließend sofort im Eisbad abgekühlt. Zelluläre Membrantrümmer und Zellkerne wurden in einem Typ 70 Ti Rotor für 20 Minuten bei 2000 x g und 4 °C pelletiert und entfernt. Um bestimmte, im Zytosol befindliche zelluläre Komponenten wie z. B. Golgi-Vesikel, endoplasmatisches Retikulum (ER) und Endosomen von den Autophagosomen zu trennen, wurde mit Hilfe eines weiteren Zentrifugationsschrittes der postnukleäre Überstand für 25 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und ein u. a. an Autophagosomen angereichertes (Ueno *et al.*, 1991), verbleibendes Pellet wurde in ca. 5 ml HB Puffer aufgenommen. Diese Suspension wurde auf einen diskontinuierlichen Nycodenz (NDZ)-Gradienten, mit von oben nach unten zunehmender Dichte (3 ml 9,5 % w/v; 1,072 g/ml Nycodenz und 2 ml 30 % w/v; 1,16 g/ml Nycodenz in HB-Puffer) geschichtet. Die Zentrifugation erfolgte im TH-641 Rotor (Sorvall, 120 Minuten bei 150000 x g und 4 °C). Nach der Zentrifugation befanden sich zwei opalisierende Banden im Zentrifugenröhrchen. Eine „leichte“ Fraktion in der Phase mit 9,5 % NDZ (als Fraktion „F1“ bezeichnet) und eine mit Autophagosomen angereicherte „schwere“ Fraktion zwischen den Phasen 9,5 %/30 % NDZ (als Fraktion „F2“ bezeichnet). Die beiden Fraktionen wurden in HB-Puffer aufgenommen und bei -80 °C gelagert. Teilmengen aus diesen Fraktionen wurden für eine Proteinbestimmung verwendet (siehe Kapitel 3.2.3.2).

3.2.4 Tierexperimentelle Methoden

3.2.4.1 Konditionstest

Der *Forced Swim Test* (Porsolt Test) stellt ein Tierexperiment dar, in dem mit Hilfe des Stressfaktors Schwimmen bei Ratten oder Mäusen ein depressionsähnlicher

Zustand induziert werden kann (Porsolt *et al.*, 1977b, Porsolt *et al.*, 1977a). Die Tiere werden in ein mit Wasser gefülltes Glas gesetzt, in dem sie mit Schwimmen und Kletterbewegungen versuchen einen Ausweg aus ihrer Lage zu finden. Nach einer gewissen Zeit geben die Tiere auf (*behavioural despair*) und lassen sich passiv treiben (*floating*). Diese Phasen der Immobilität bzw. des Schwimmens können gemessen werden und stellen ein Maß für Depression bzw. Stress dar.

Im vorliegenden Fall wurde der Porsolt Test etwas modifiziert und als Maß für die Kondition der Mäuse herangezogen.

Parameter bei der Versuchsdurchführung:

- ⇒ Becherglas: Höhe: 25 cm, Durchmesser: 20 cm
- ⇒ Befüllung mit Wasser: bis zu einer Höhe von 15 cm des Glases
- ⇒ Wassertemperatur: konstant zwischen 27 °C und 29 °C
- ⇒ Messzeit: 4 min mit einer Vorschwimmzeit von 2 min
- ⇒ Immobilitätszeit notiert in Sekunden

Die immobilen und mobilen Phasen wurden manuell mit einer Stoppuhr aufgezeichnet, wobei eine Schwimm- bzw. Kletterbewegung der Tiere als mobil ausgewertet wurde und ein *floating* (kleine, langsame Bewegungen um den Kopf über Wasser halten zu können bzw. leichtes Schwanken des Gesamtkörpers) als immobil ausgewertet wurde. Der Versuch wurde dreimal mit Tiergruppen (n = 4 - 6) unterschiedlichen Genotyps (Wildtyp und $G\alpha_{i3}$ -defiziente Tiere; Sv129/C57BL/6 gemischter Hintergrund) und Geschlechts pro Versuchseinheit durchgeführt. Die Versuche wurden in der nachtaktiven Phase der Mäuse (Beginn ca. 17 Uhr, Ende ca. bis 20 Uhr) durchgeführt, um den zirkadianen Rhythmus der Tiere zu berücksichtigen.

3.2.4.2 Langzeitbeobachtung von Wildtyp-Mäusen vs. $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen

Die Durchführung der Langzeitstudie erfolgte in der Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Für diese Studie wurden Zuchtpaare mit Wildtyp-Mäusen und $G\alpha_{i3}$ -homozygoten-Mäusen angesetzt (Verpaarung Wildtyp-mit Wildtyp- und *knockout*- mit *knockout*-Maus). Die Mäuse wurden über mindestens fünf Generationen in einen C57BL/6-Hintergrund zurückgekreuzt. Aus dieser Zucht (Stamm 1004) wurden insgesamt 80 Mäuse (40 Wildtyp-Mäuse / 40 konstitutiv $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse; jeweils 20 männliche und 20 weibliche Mäuse) unter SPF (*specific pathogen free*)-Bedingungen über einen Zeitraum von 05/2007 bis 10/2009 in einem Überdruckisolator beobachtet. Die hygienische Sanierung erfolgte mittels eines

Embryonentransfers, die Tiere gelten daher als frei von Krankheitserregern wie Bakterien, Pilze und Viren. Alle 80 Tiere wurden im Mai 2007 zeitgleich in die Langzeitstudie aufgenommen, mit einer Altersspanne von 78 bis 152 Tagen. Die Wildtyp- sowie die $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuse stammen jeweils aus unterschiedlich großen Würfen. Täglich wurden die Tiere beobachtet und auftretende Unregelmäßigkeiten im Verhalten und im Erscheinungsbild der Tiere sowie etwaige Veränderungen in den Haltungsbedingungen protokolliert. Im Zeitraum von 05/2007 bis 05/2009 wurde einmal monatlich das Gewicht aller Tiere erfasst. Da die insgesamt 80 Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten geboren wurden, resultierten aus der 1-monatlichen Wägung unterschiedliche Körpergewichte zu unterschiedlichen Lebenstagen. Daher wurde für die Darstellung der Gewichtskurven (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.2.3.1, Abbildung 28) eine Anzahl n von Tieren zusammengefasst die ein Altersband von bis zu sieben Tagen umfasst. Die Angabe des Alters in Tagen auf der Abzisse sowie das Gewicht der Tiere auf der Ordinate stellen daher jeweils Mittelwerte dar. Zwischen 05/2009 und 10/2009 wurden die Tiere nicht gewogen sondern nur beobachtet und der Zeitpunkt des Todes notiert (für die Kaplan-Maier-Studie), sowie bei ausgeschleusten Tieren das Blut für die Serumanalytik entnommen.

Um eine eingehende Charakterisierung aller 80 Mäuse vornehmen zu können und eventuelle phänotypische Unterschiede der Genotypen und Geschlechter feststellen zu können, wurden bei den verstorbenen Tieren einige relevante Parameter wie Körper- und Organgewicht, klinische biochemische Serumwerte und histologische Untersuchungen der Organe dokumentiert. Die Blutentnahme der Mäuse erfolgte über eine Herzpunktur. Die Seren wurden bis zur analytischen Untersuchung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Analyse der Seren erfolgte bei der Firma Charles River Laboratories, Research Models and Services, Germany GmbH, Sulzfeld. Tabelle 9 zeigt eine Auflistung der untersuchten klinischen Parameter und deren Analysenmethode. Darüberhinaus wurden die Mäuse seziiert und Gewebe und Organe in 4 % Formalin/PBS konserviert, um diese für spätere histologische Untersuchungen verwenden zu können. Kranke, auffällige Tiere, bei denen von einem nahen Tod ausgegangen werden konnte, wurden aus der Studie genommen. Dies war notwendig, um eine autolytische Zersetzung von Blut und Organen eines verstorbenen Tieres zu vermeiden. Nicht bei allen gelang diese Vorgehensweise. Zum Teil verstarben die Tiere über Nacht und lagen bereits tot im Käfig, so dass eine Blut- und Organentnahme, und daher die Untersuchung der klinisch-chemischen Parameter, nicht bei allen 80 Tieren möglich war (siehe Anhang, Kapitel 9.5).

Tabelle 9 Übersicht der verwendeten Methoden in der Serumanalytik

Klinischer Parameter	Analysenmethode (Charles River Lab.)
ALT	- IFCC-Methode*
AP	- IFCC-Methode
AST	- IFCC-Methode
Bilirubin	- 2,5-Dichlorphenyldiazoniumtetrafluoborat (DPD)
Albumin	- Immunologischer Trübungstest
Gesamteiweiß	- Biuret-Methode
Harnstoff	- Kinetischer UV-Test
Kreatinin	- Jaffé-Methode
Kreatinkinase	- UV-Test, gemäß IFCC
Cholesterin	- Enzymatischer Farbtest
Triglyceride	- Enzymatischer Farbtest
Glukose	- Hexokinase UV-Test
Natrium	- ISE (Ionenselektive Elektrode)
Kalium	- ISE (Ionenselektive Elektrode)
Kalzium	- Kresolphthalein-Methode (Komplexbildung)
Phosphat-anorg.	- Ammoniumphosphomolybdat (Komplexbildung)
Chlorid	- ISE (Ionenselektive Elektrode)

*IFCC = International Federation of Clinical Chemistry

Der Keimstatus wurde durch regelmäßige Untersuchungen des Einstreus überprüft. Die Tiere wurden bei freiem Futter- und Wasserzugang (22 ± 2 °C; relative Luftfeuchtigkeit 55 ± 5 %; mit 12 Stunden-Lichtrhythmus) und gefilterter Luft gehalten. Die Haltung der Tiere entsprach einer standardisierten Nagetierhaltung. Die Mäuse bekamen über den gesamten Zeitraum bestrahltes Futter und angesäuertes (pH 2,8 – 3,3), sterilisiertes Wasser. Die Analyse der Überlebenszeit erfolgt mittels des Kaplan-Meier-Schätzers. Hierbei wurde als Todesfall der natürliche Tod, sowie im Fall von z. B. nicht-heilenden, offenen Wunden, das vorzeitige Töten eines Tieres definiert.

4 **ERGEBNISSE**

4.1 ***Funktion von $G\alpha$ -Proteinen in der Autophagie***

Studien an der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 lassen eine Involvierung der heterotrimeren G-Proteine der Pertussistoxin (PTX)-sensitiven G_i -Familie, insbesondere $G\alpha_{i3}$, in der autophagischen Sequestrierung vermuten (Ogier-Denis *et al.*, 1995, Petiot *et al.*, 1999), jedoch fehlten bislang Untersuchungen an nativen Geweben, welche die Zellkultur-Daten belegen. Daher wurden biochemische und zellbiologische Methoden u. a. *In-situ*-Leberperfusionsuntersuchungen in $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen angewendet, um die biologischen Funktionen der G_i -Proteine zu untersuchen.

Um die Rolle von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ für die Regulation der autophagischen Proteolyse in der Leber zu untersuchen, wurde die autophagische Aktivität mit *In-situ*-Leberperfusionsexperimenten in Ab- und Anwesenheit von PTX sowie in $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -defizienten Lebern gemessen. Diese Untersuchungen wurden von unserer Arbeitsgruppe in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Häussinger (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf) durchgeführt (Gohla *et al.*, 2007b). Die Methode der *In-situ*-Leberperfusion zur Analyse der autophagischen Aktivität beruht auf einer *pulse-chase* Markierung langlebiger Proteine und der anschließenden Detektion ihrer peptidischen Degradationsprodukte. Insulin und Aminosäuren sind etablierte, physiologische Inhibitoren der autophagischen Proteolyse (siehe Einleitung, Kapitel 1.3.4.4). Die Daten zeigen, dass die durch Aminosäureentzug induzierte hepatische Autophagie durch Insulin sowie durch Phenylalanin in Mäusen, vergleichbar mit der Wirkung des Hormons in Rattenlebern (Häussinger *et al.*, 1999, Mortimore & Schworer, 1977), reversibel um etwa 25 % inhibiert werden konnte. Weiterhin wurde gezeigt, dass $G\alpha_{i3}$, nicht aber das in der Leber vorherrschende $G\alpha_{i2}$, in der Insulin- und Aminosäure-vermittelten Inhibierung der hepatischen autophagischen Proteolyse involviert zu sein scheint.

4.1.1 ***Die murine Hepatozytenkultur***

Eine potentielle Rolle der in Lebergewebe exprimierten G_i -Isoform $G\alpha_{i3}$ in der autophagischen Proteolyse wurde in *In-situ*-Leberperfusionsversuchen mit $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen gezeigt (siehe Anhang, Kapitel 9.1). Die spezifischen Funktionen von $G\alpha_{i3}$ in der $G\alpha_{i3}$ -vermittelten anti-autophagischen Wirkung von Insulin

bzw. Phenylalanin sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf zellulärer Ebene untersucht werden. Diese Fragestellung erforderte die Isolierung, Kultivierung und Handhabung primärer muriner Hepatozyten aus $G\alpha_{i3}$ - im Vergleich zu $G\alpha_{i2}$ -defizienten und wildtypischen Mäusen. Hierzu musste eine robuste Methode für die Isolierung und Kultivierung muriner Hepatozyten etabliert werden (siehe Methoden, Kapitel 3.2.2.6).

4.1.1.1 Auswirkung von Perfusionsparametern auf die Viabilität der Hepatozyten

Hepatozyten sind in der Leber über Zellkanäle (*tight*, *intermediate* und *gap junctions*) sowie über Desmosomen mit anderen Zellen eng verbunden. Darüber hinaus werden zwischen den Hepatozyten Gallenkanäle mit Mikrovilli ausgebildet. Diese Zellkontaktstrukturen werden im Rahmen der Hepatozytenisolierung durch Kollagenase enzymatisch abgebaut, und können sich dann bei der Kultivierung der Zellen erneut ausbilden, wenn eine genügende Adhäsion der Zellen an die Zellkulturschalen gegeben ist (siehe Methoden, Kapitel 3.2.2.6.6). Die Isolation der Hepatozyten aus der Mäuseleber erfolgte nach einem Protokoll von Markus Mroz (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf), anhand der Zwei-Schritt-Kollagenase-Perfusionstechnik nach Seglen (Seglen, 1976), das wie unter Methoden, Kapitel 3.2.2.6.4 beschrieben, modifiziert wurde. Hierbei wurde die Leber zuerst mit einem größeren Volumen Kalzium-freien Mediums entblutet (Perfusionsfluss 6 - 7 ml/min). Anschließend erfolgte der enzymatische Gewebeaufschluß mit Kollagenase. Durch die Perfusion mit Kalzium-freiem Medium werden Kalzium-Ionen aus den Desmosomen eluiert, was zu einer großen Zellausbeute mit geringer Zellschädigung führt (Berry *et al.*, 1991, Berry & Edwards, 2000, Seglen, 1976). Dem Kollagenase-haltigen Perfusionsmedium wurden dann wieder Ca^{2+} -Ionen (etwa 4,5 mM) zugeführt (Perfusionsfluss 7 – 8 ml/min), da dies für die optimale Kollagenaseaktivität wichtig ist (Seglen, 1976). Ein Zusatz von Heparin zum Kulturmedium zur Hemmung der Blutgerinnung ist hingegen nicht notwendig, da die Leber schnell entblutet wurde und dadurch eine relativ geringe Gefahr der Thrombenbildung bestand. Die Puffer wurden konstant bei 37 °C gehalten und mit Carbogen (95 % O_2 ; 5 % CO_2) mit Hilfe eines Oxygenators belüftet. Das Perfusionsmedium wurde mit HEPES gepuffert. Ein wichtiger Parameter der Auswirkungen auf die Viabilität der Hepatozyten hat, stellt der Perfusionsdruck unter Isolierungsbedingungen dar. Druckschwankungen im Perfusionssystem können zu einem Barotrauma der Leber führen und Schädigungen der sinusoidalen Leberendothelzellen mit sich bringen (Bessems *et al.*, 2006). Weiterhin können bei der Belüftung der Puffer Luftblasen entstehen, die zu einer Luftembolie der Lebervenenolen

und zu einer starken Schwellung des Lebergewebes führen können (Seglen, 1976). Beides kann irreparable Schädigungen der Hepatozyten mit sich bringen (Pagliara *et al.*, 2003). In Abbildung 11A ist eine beispielhafte Schädigung des Lebergewebes dargestellt, die durch starke Druckschwankungen und Luftblasen während der Perfusion hervorgerufen wurde. Diese pathologische Veränderung des Lebergewebes resultierte in beschädigten apoptotischen Hepatozyten (Abbildung 12A), die durch ein vermindertes Zellvolumen, das Auftreten von Membranbläschen und einer deutlichen Granulierung gekennzeichnet waren. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde das Perfusionssystem bzgl. der Verminderung von Druckschwankungen, Luftblasen und Volumenänderungen des Perfusates optimiert. Abbildung 11B zeigt eine Leber, bei der es während der Perfusion zu keinen negativen Einflüssen kam und bei der keine äußerlichen Schädigungen der Leber erkennbar sind. Aus dieser Leber konnten viable Leberzellen isoliert werden (Abbildung 12B).

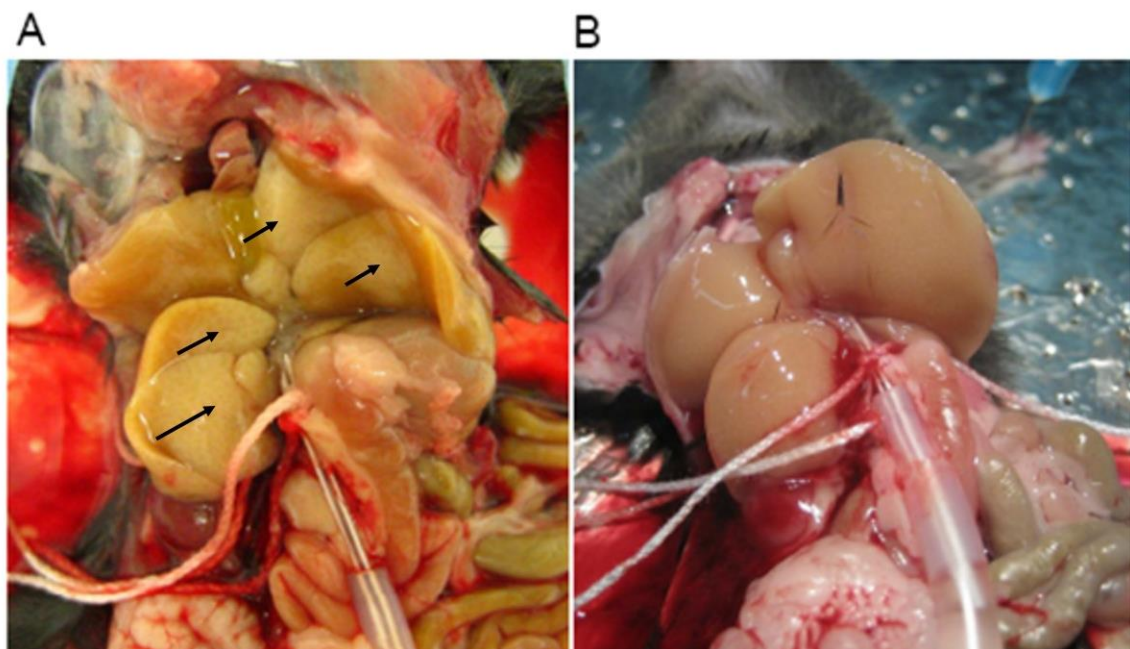


Abbildung 11. Auswirkung von Druckschwankungen auf das Lebergewebe

Dargestellt sind Lebern während der Perfusion. (A) Leber zeigt Areale mit zerfallenem Gewebe, die durch Luftblasen und Druckschwankungen während der Perfusion ausgelöst wurden (Pfeile). (B) Gleichförmig perfundierte Leber ohne erkennbare äußerliche Schädigungen des Gewebes.

Abbildung 12 zeigt in Kulturschalen gegebene Hepatozyten, die aus den jeweiligen Lebern aus Abbildung 11 isoliert wurden.

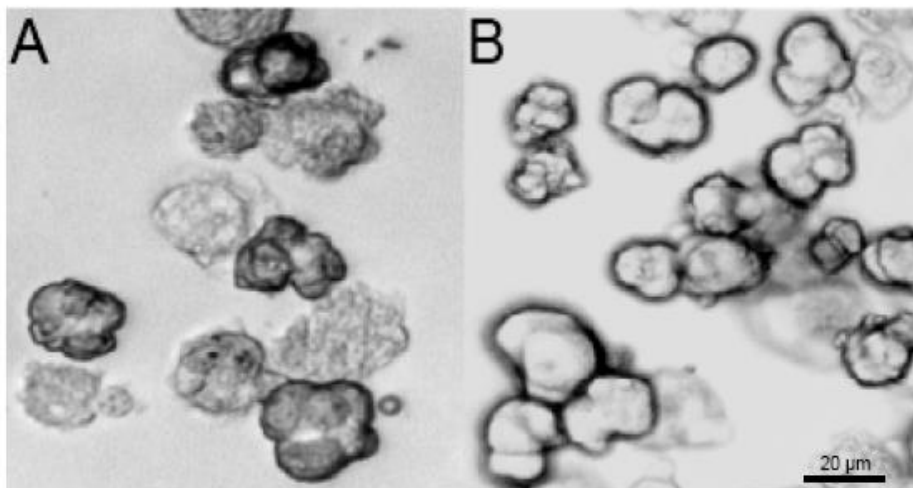


Abbildung 12. Isolierte apoptotische und viable Hepatozyten

Lichtmikroskopische Aufnahmen von Leberzellen wenige Minuten nach dem Ausbringen auf Kulturschalen. (A) zeigt apoptotische Hepatozyten, welche aus einer beschädigten Leber (Abbildung 11A) isoliert wurden. (B) Viable Hepatozyten, die aus einer unbeschädigten Leber (Abbildung 11B) stammen.

4.1.2 Etablierung Isoform-spezifischer Antikörper gegen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$

Um die Funktion von $G\alpha_{i3}$ bei der autophagischen Proteolyse analysieren zu können, mussten zunächst polyklonale $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -Isoform-spezifische Antikörper generiert werden. Die Antikörper sollten für Immunoblot- sowie in Immunofluoreszenz-Analysen geeignet sein. Die Antiseren wurden nicht von uns erzeugt. Jedoch wurden die immunogenen Sequenzen mit uns besprochen (siehe Methoden, Kapitel 3.2.3.3). Mögliche unspezifische Interaktionen der Antikörper wurden reduziert, indem die Antikörper an Acetonpuder präadsorbiert wurden. Die Auswahl der Peptidsequenzen, die Präadsorption an Acetonpuder und die Aufreinigung der Antiseren ist unter Methoden, Kapitel 3.2.3.3 beschrieben. Im Falle des $G\alpha_{i3}$ -spezifischen Antikörpers wurde dieser an $G\alpha_{i3}$ -defizientem Mausleber-Acetonpuder sowie an $G\alpha_{i3}$ -defizientem MEF-Acetonpuder präabsorbiert, um mögliche unspezifische Bindungen in immunzytochemischen Färbungen von Hepatozyten und MEFs zu minimieren. Mit den gewählten Bedingungen gelang es, einen polyklonalen Antikörper gegen $G\alpha_{i3}$ zu generieren, der in affinitätsgereinigter Form spezifisch $G\alpha_{i3}$ in Ganzzell-Lysaten von wildtypischen und $G\alpha_{i2}$ -defizienten primären Hepatozyten und Maus-embryonalfibroblasten erkennt (siehe Abbildung 13A links, rechts: Peptid-blockiert). Darüberhinaus kann der $G\alpha_{i3}$ -Antikörper für die Detektion von $G\alpha_{i3}$ in der Immunfluoreszenz-Analytik verwendet werden (Abbildung 13B). Diese Ergebnisse sind bemerkenswert, da sich die verwendete C-terminale Peptidsequenz zur Herstellung des

$G\alpha_{i3}$ -spezifischen Antikörpers in nur zwei Aminosäuren von der korrespondierenden $G\alpha_{i2}$ - bzw. der $G\alpha_{i1}$ -Peptidsequenz unterscheidet (siehe Tabelle 4, Methoden, Kapitel 3.2.3.3). Auch in nachfolgenden Ansätzen konnten mit Hilfe der immunogenen Sequenz polyklonale Antikörper erzeugt werden, die die gleiche Spezifität und Selektivität im Immunoblot und Immunocytochemie zeigten (Ezan *et al.*, 2013, Wiege *et al.*, 2012, Wiege *et al.*, 2013). Allerdings könnte es in neuronalen Geweben zu einer Kreuzreaktivität mit $G\alpha_{i1/i2}$ kommen. $G\alpha_{i3}$ wird im Gegensatz zu $G\alpha_{i1/i2}$ allerdings hauptsächlich in nicht-neuronalen Geweben exprimiert (Gohla *et al.*, 2007b), weshalb die Kreuzreaktivität des Antikörpers bei einer Anwendung in nicht-neuronalen Geweben und Zellen vernachlässigbar ist. Aufgrund dieser Kreuzreaktivität wird im Gehirn im Immunoblot eine schwache Bande (vermutlich entsprechend der $G\alpha_i$ -Isoform $G\alpha_{i2}$) sichtbar (Abbildung 14A; 5. Spur).

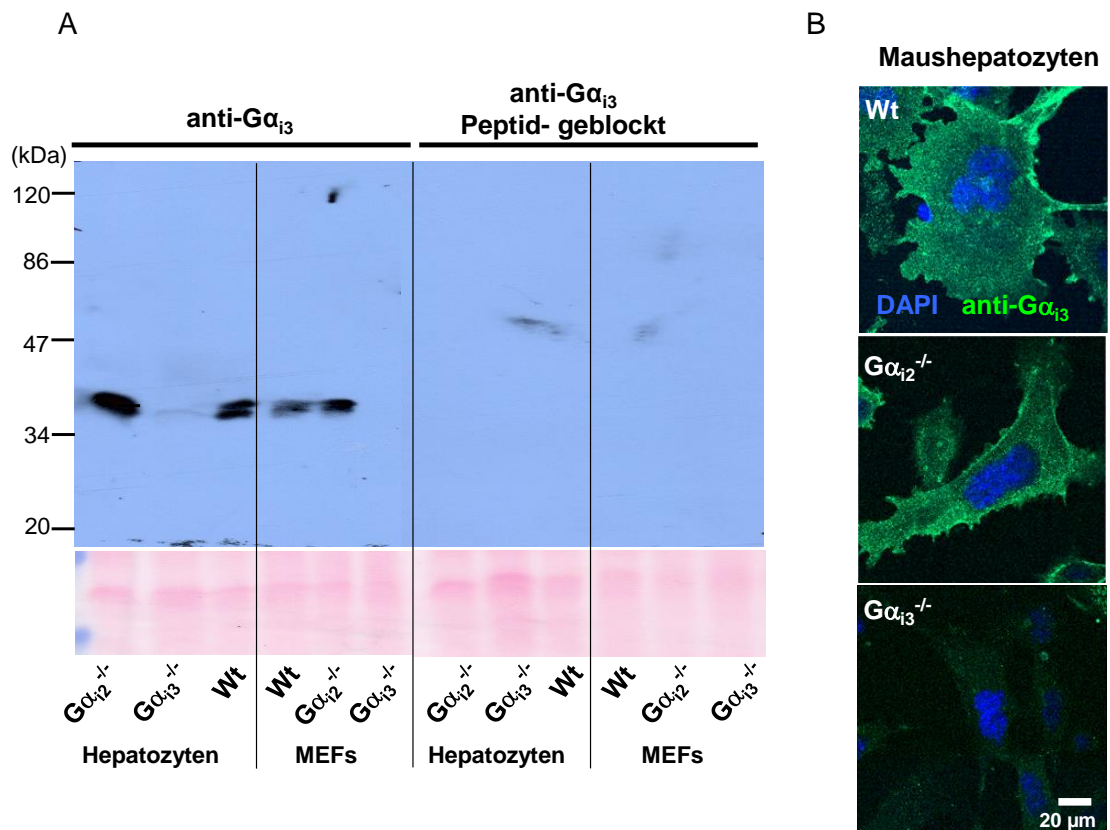


Abbildung 13. Der $G\alpha_{i3}$ -Antikörper erkennt spezifisch das $G\alpha_{i3}$ -Protein

(A) Ganzzell-Lysate (30 μ g) von Wildtyp (Wt)-, $G\alpha_{i2}$ - oder $G\alpha_{i3}$ -defizienten Hepatozyten und Mausembryonal-Fibroblasten (MEFs) wurden auf einem 6 M Harnstoff SDS-PAGE Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membranen geblottet und mit dem affinitätsgereinigten, polyklonalen $G\alpha_{i3}$ -Antikörper (Verdünnung 1:5000) bzw. dem Peptid-geblockten $G\alpha_{i3}$ -Antikörper (Verdünnung 1:5000) inkubiert. Der Antikörper erkennt spezifisch $G\alpha_{i3}$, nicht aber die nahe verwandte $G\alpha_{i2}$ -Isoform (links). Das Fehlen von $G\alpha_{i2}$ induziert eine Hochregulation $G\alpha_{i3}$ -Proteins, wohingegen der Proteinspiegel des $G\alpha_{i2}$ bei Fehlen von $G\alpha_{i3}$ nahezu unverändert bleibt. Der rechte Teil des Immunoblots zeigt, dass die Vorinkubation des $G\alpha_{i3}$ -Antikörpers mit dem $G\alpha_{i3}$ -Peptid die Immunodetektion von $G\alpha_{i3}$ effektiv blockiert. Als Beladungskontrolle ist ein Ausschnitt der Ponceau S-gefärbten Nitrozellulose-Membran im Bereich zwischen 34 kDa und 47 kDa dargestellt. (B) Primäre Maushepatozyten von Wt-, $G\alpha_{i2}$ -defizienten sowie $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen wurden mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit dem affinitätsgereinigten, polyklonalen $G\alpha_{i3}$ -Antikörper (Verdünnung 1:1000) und anschließender Inkubation mit Alexa 488-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gefärbt. Der Antikörper erkennt spezifisch $G\alpha_{i3}$ nicht aber $G\alpha_{i2}$. Dargestellt sind konfokale Lasermikroskopiebilder (optische Schichtdicke 0,5 μ m; n = 3). Diese Abbildung stammt aus der Publikation (Gohla *et al.*, 2007b).

Parallel zum $G\alpha_{i3}$ -spezifischen Antikörper wurde ein Antikörper gegen $G\alpha_{i2}$ entwickelt und durch Affinitätschromatographie und Präadsorption an Acetonpulver aus $G\alpha_{i2}$ -defizienten MEFs aufgereinigt. Abbildung 14 zeigt, dass der aufgereinigte $G\alpha_{i2}$ -Antikörper nicht nur das in peripheren Geweben exprimierte $G\alpha_{i2}$, sondern aufgrund der identischen C-terminalen Peptidsequenz von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i1}$ (siehe Tabelle 4, Methoden, Kapitel 3.2.3.3) auch das hauptsächlich neuronal exprimierte $G\alpha_{i1}$ detektiert. Aufgrund dieser Kreuzreaktivität werden Proteine aus dem Gehirn im Immunoblot mit zwei Banden (entsprechend den $G\alpha_i$ -Isoformen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i1}$) sichtbar (Abbildung 14A; 5. Spur). Analog zu dem $G\alpha_{i3}$ -Isoform-spezifischen Antikörper (Abbildung 13) erkennt der gegen die $G\alpha_{i2}$ -Isoform gerichtete Antikörper jedoch nicht unter den gewählten Versuchsbedingungen das nahe verwandte und ebenfalls in peripheren Geweben exprimierte $G\alpha_{i3}$ (Abbildung 14).

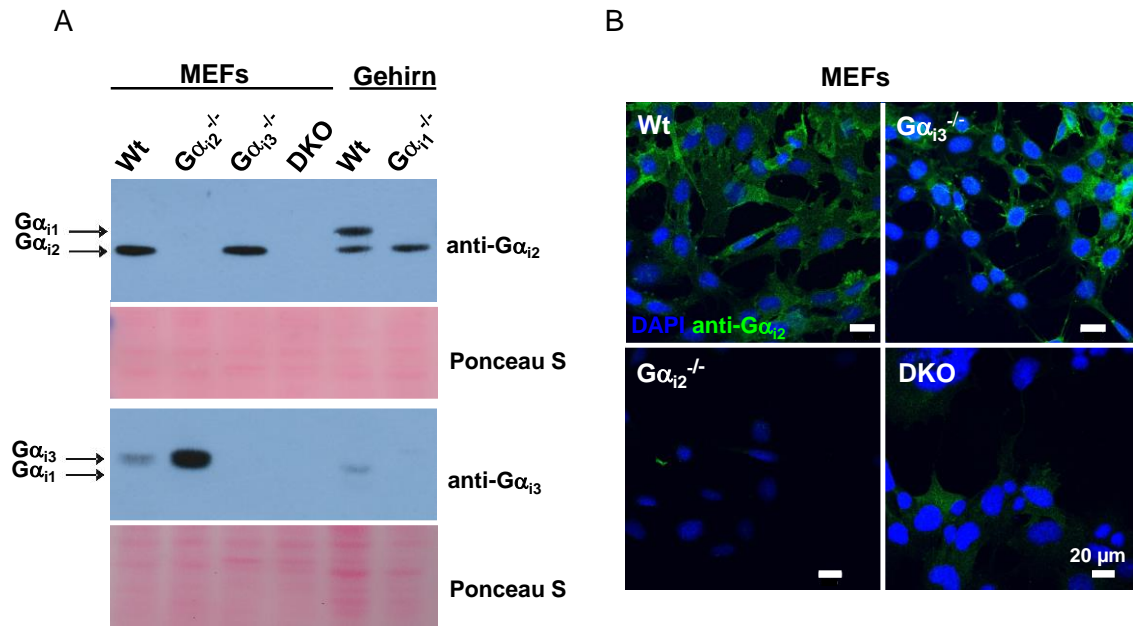


Abbildung 14. Der Gα_{i2}-Antikörper erkennt spezifisch das Gα_{i2}-Protein

(A) Membranproteine (10 µg) von Wildtyp (Wt)-, Gα_{i2}^{-/-}, Gα_{i3}^{-/-} oder Gα_{i2/i3}-doppeldefizienten (DKO) Mausembryonalfibroblasten (MEFs) bzw. Membranproteine aus Gehirn (10 µg) von Wildtyp (Wt) und Gα_{i1}-defizienten Mäusen wurden auf einem 6 M Harnstoff SDS-PAGE Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran geblottet und mit dem affinitätsgereinigten, polyklonalen Gα_{i3}-Antikörper (1:5000) bzw. Gα_{i2}-gerichteten Antikörper (1:1000) inkubiert. In nicht-neuronalen Zellen wie MEFs erkennt der gegen Gα_{i3}-gerichtete Antikörper spezifisch Gα_{i3}, nicht aber die nahe verwandte Gα_{i2}-Isoform. In Lysaten aus Mäusegehirn ist eine schwache Kreuzreaktivität des Antikörpers mit der v. a. in neuronalen Geweben exprimierten Gα_{i1}-Isoform zu erkennen. Der Immunoblot wurde freundlicherweise von Herrn Dipl.-Biol. Fabian Kuck, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Universitätsklinikum Düsseldorf zur Verfügung gestellt. (B) Mausembryonalfibroblasten von Wildtyp (Wt), Gα_{i2}-defizienten, Gα_{i3}-defizienten oder Gα_{i2/i3}-doppeldefizienten (DKO) Mäusen wurden mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit dem affinitätsgereinigten, polyklonalen Gα_{i2}-Antikörper (1:150) und anschließender Inkubation mit fluoreszenz-konjugiertem Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper gefärbt. Der Gα_{i2}-Antikörper erkennt spezifisch Gα_{i2}. Das Signal in den Gα_{i2/i3}-doppeldefizienten MEFs (DKO) beruht wahrscheinlich auf einer kompensatorischen Hochregulation von Gα_{i1}. Dargestellt sind konfokale Lasermikroskopieaufnahmen (optische Schichtdicke 0,5 µm; n = 3, Balken entspricht 20 µm).

Abbildung 14B zeigt, dass der Gα_{i2}-Antikörper Wt- und Gα_{i3}-defiziente MEFs spezifisch färbt, jedoch kein Signal in Gα_{i2}-defizienten MEFs zu beobachten war. Interessanterweise war jedoch in Gα_{i2/i3}-doppeldefiziente Zellen (DKO) ein Immunfluoreszenz-Signal mit dem Gα_{i2}-gerichteten Antikörper detektierbar (Abbildung 14B). Es ist zu vermuten, dass dieses Signal durch eine kompensatorische Hochregulation von Gα_{i1} in Abwesenheit von Gα_{i2/i3} bedingt ist. Diese Resultate legen nahe, dass der Gα_{i2}-Antikörper vornehmlich zur Detektierung des Gα_{i2}-Proteins in peripheren Geweben geeignet ist, in denen Gα_{i1} nicht bzw. nur gering exprimiert wird. In beiden Abbildungen (Abbildung 13A und Abbildung 14A) ist gut zu erkennen, dass bei einem Fehlen von Gα_{i2} die Expression von Gα_{i3} merklich erhöht war im Vergleich

zu den wildtypischen Zellen. Im Gegensatz dazu, führt das Fehlen von $G\alpha_{i3}$ nicht zu einer deutlichen Detektierbarkeit von $G\alpha_{i2}$. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine Hochregulation des $G\alpha_{i3}$ -Proteins möglicherweise die Funktionen von $G\alpha_{i2}$ in $G\alpha_{i2}$ -defizienten Zellen kompensieren kann, wohingegen die Proteingehalte von $G\alpha_{i2}$ in wildtypischen Zellen ausreichend sind, um die Funktionen von $G\alpha_{i3}$ in $G\alpha_{i3}$ -defizienten Zellen substituieren zu können (Abbildung 14A).

4.1.3 Validierung eines LC3-Antikörpers für Immunzytochemie

Verschiedene Publikationen beschreiben eine Assoziation von $G\alpha_{i3}$ mit Membranen des Golgi-Apparates und der Endosomen (Lou *et al.*, 2002, Meijer & Codogno, 2006, Ogier-Denis *et al.*, 1995). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass $G\alpha_{i3}$ in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 eine Rolle bei der Regulierung der autophagischen Sequestrierung und des Vesikeltransports spielt (Petiot *et al.*, 1999). Neben Mitochondrien werden auch Endomembranen, die sich vom Golgi-Apparat und dem endoplasmatischen Retikulum ableiten, als biologische Ausgangsmembranen für die Bildung von autophagischen Vesikeln angesehen (Hailey *et al.*, 2010, Reggiori *et al.*, 2004). Daher sollte mit Hilfe des affinitätsgereinigten, $G\alpha_{i3}$ -spezifischen Antikörpers der Frage nachgegangen werden, ob $G\alpha_{i3}$ auch im Rahmen der hepatozytären Autophagie auf Endomembranen lokalisiert.

Die hepatozytäre autophagische Aktivität wurde durch einen kurzen Aminosäure- und Wachstumsfaktorentzug stimuliert. Das *light-chain protein 3* (LC3) wurde als etablierter, spezifischer Marker für die Membranen autophagischer Vesikel verwendet (Tanida *et al.*, 2004). Da der polyklonale anti- $G\alpha_{i3}$ Antikörper aus Kaninchen aufgrund von Spezies-Kreuzreaktivität jedoch nicht zusammen mit dem routinemäßig zur Detektion autophagischer Vesikel verwendeten polyklonalen Kaninchen anti-LC3 Antikörper (Antikörper von Dr. Yasuo Uchiyama, siehe Material, Kapitel 3.1.5) (Kabeya *et al.*, 2000) eingesetzt werden konnte, musste zunächst ein anderer geeigneter anti-LC3 Antikörper validiert werden. Hierzu wurde ein polyklonaler Ziege anti-LC3 Antikörper (Antikörper *sc-16756*, siehe Material, Kapitel 3.1.5) für immunozytochemische Anwendungen in Hepatozyten getestet. Da dieser Antikörper jedoch weder endogenes noch überexprimiertes LC3 in Immunoblot-Experimenten detektieren konnte, wurden primäre Maushepatozyten mit GFP-LC3 transfiziert (siehe Methoden, Kapitel 3.2.2.1), nach Induktion der Autophagie fixiert, und parallel mit dem polyklonalen anti-LC3 Antikörpern aus Kaninchen oder Ziege gefärbt. Hepatozyten, die unter Nährstoff-

reichen Bedingungen kultiviert werden, zeigen eine basale autophagische Aktivität mit einer Kolo-kalisation des exprimierten GFP-LC3 mit dem Ziege anti-LC3 Antikörper an typische becherförmige (*cup-shaped*) Kompartimente (Abbildung 15 und Abbildung 16, siehe Pfeile). Um Lyosomen bzw. Autolysosomen sichtbar zu machen, wurde in den letzten 30 Minuten vor der Fixierung der Zellen LysoTracker Red in das Inkubationsmedium hinzugegeben. Unter Nährstoff-reichen Bedingungen bilden sich jedoch kaum Autolysosomen aus, was sich in einer geringen Überlappung von im Zytosol verstreuten LysoTracker markierten Lysosomen mit LC3-positiven Autophagosomen zeigt (Abbildung 16).

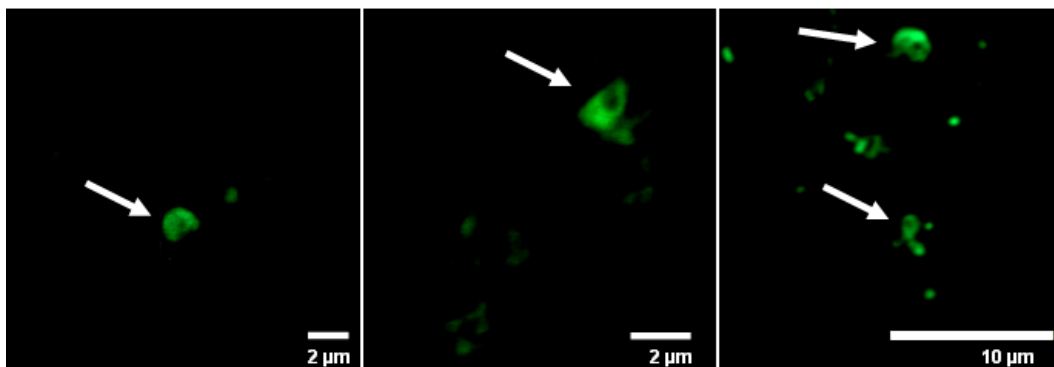


Abbildung 15. Lokalisation von GFP-LC3 an Präautophagosomen

Primäre Maushepatozyten wurden mit GFP-LC3 transient transfiziert und fixiert. GFP-LC3 könnte an ringartige Präautophagosomen (Pfeile) lokalisieren. Dargestellt sind konfokale Lasermikroskopiebilder.

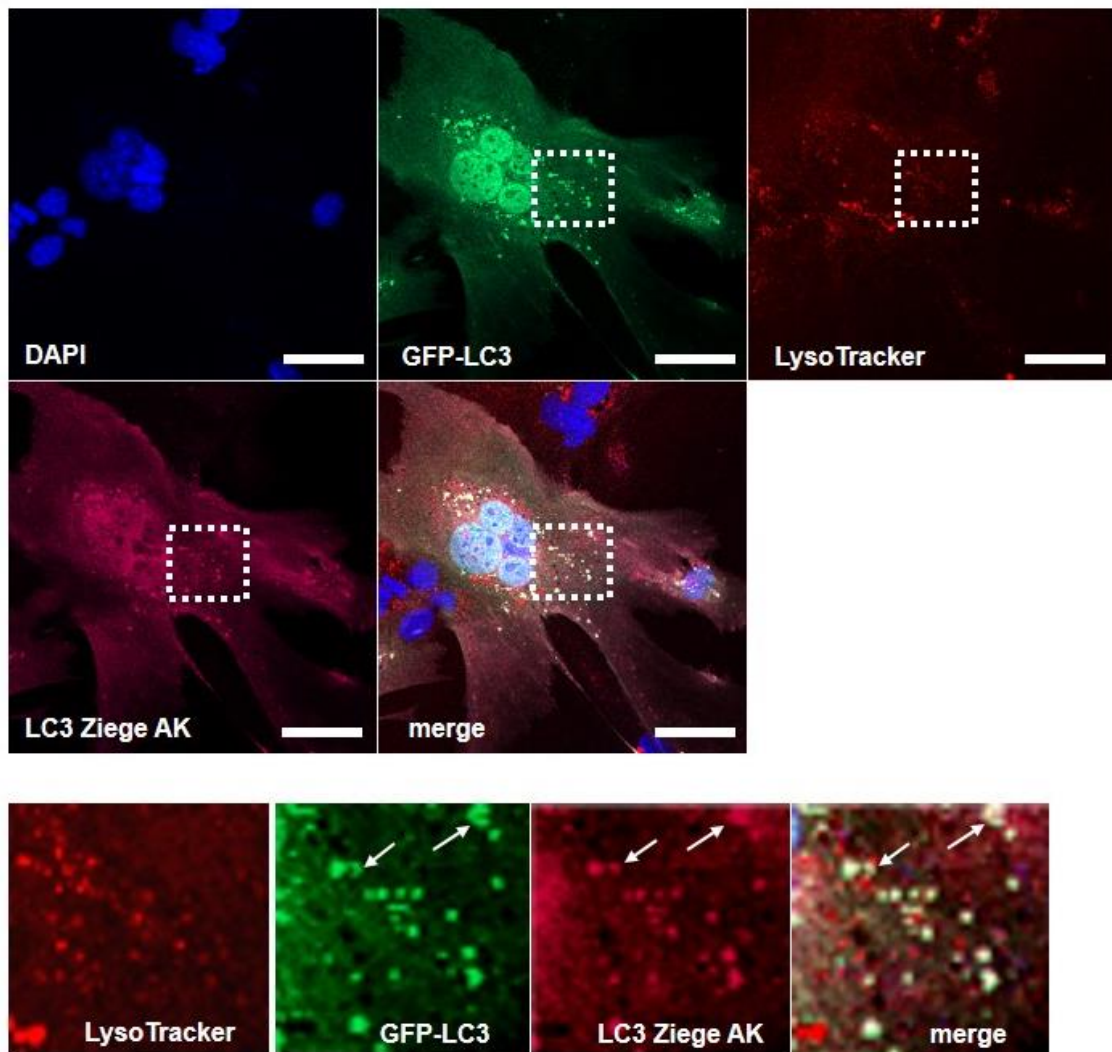


Abbildung 16. Validierung des polyklonalen anti-LC3 Ziegen-Antikörpers mit Hilfe von Hepatozyten

Primäre Maushepatozyten wurden mit GFP-LC3 transient transfiziert und zur Darstellung lysosomaler bzw. saurer Kompartimente mit LysoTracker (75 nM, 30 Minuten) inkubiert. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert, mit Triton X-100 permeabilisiert und mit einem polyklonalen anti-LC3 Ziege-Antikörper (LC3 Ziege AK) und einem fluoreszenz-markierten anti-Ziege IgG Sekundärantikörper gefärbt. GFP-LC3 lokalisiert an ringartige Präautophagosomen (Pfeile), welche auch mit dem Ziege anti-LC3 Antikörper detektiert werden. Da die Hepatozyten in einem Standardmedium kultiviert und die basale Autophagie nicht durch Nährstoffentzug stimuliert wurde, zeigen die mit LysoTracker markierten sauren Kompartimente unter diesen Bedingungen kaum eine Überlappung mit LC3-positiven Autophagosomen. Die unterste Reihe zeigt eine vierfache Vergrößerung der gestrichelten Kästen. Die weiße Farbe im Überlagerungsbild (merge) zeigt die Kolo-kalisation der fluoreszenz-markierten Proteine. Dargestellt sind konfokale Lasermikroskopiebilder ($n = 2$, Balken entspricht 50 μm). Diese Abbildung stammt aus der Publikation (Gohla *et al.*, 2007b) und wurde als Titelbild der Februar-Ausgabe von Proc Natl Acad Sci USA, Vol. 104, Februar 20 (2007) verwendet.

Darüberhinaus zeigte sich, dass der anti-LC3 Ziegen-Antikörper die gleichen intrazellulären autophagosomalen Strukturen in Autophagie-induzierten Hepatozyten färbte wie der anti-LC3 Kaninchen-Antikörper (Abbildung 17). Zusammen zeigen diese

Ergebnisse, dass der polyklonale anti-LC3 Ziegen-Antikörper zuverlässig für die immunzytochemische Detektion autophagischer Vesikel in Maushepatozyten eingesetzt werden kann.

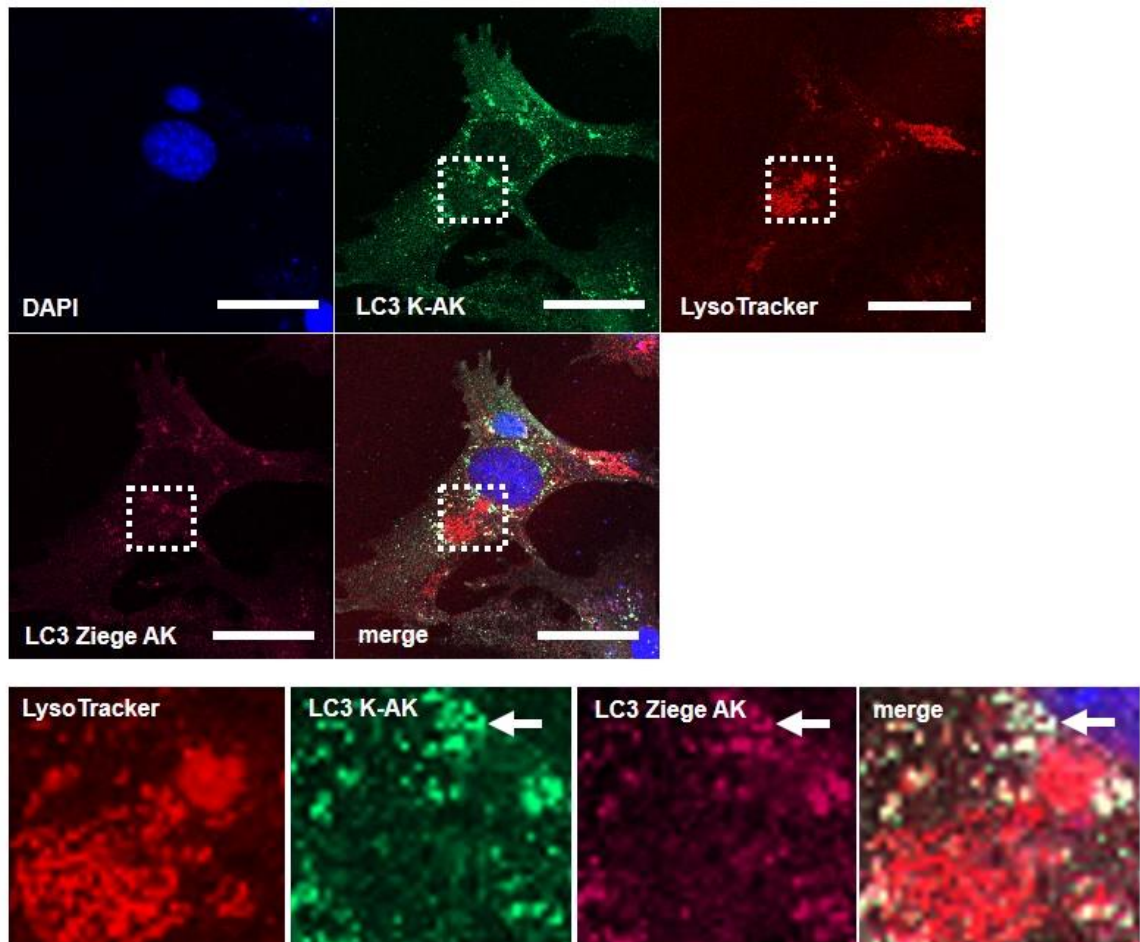


Abbildung 17. Validierung des polyklonalen anti-LC3 Ziegen-Antikörpers in Hepatozyten nach Stimulation der autophagischen Aktivität

Primäre Hepatozyten wurden mit Rapamycin (200 nM, 24 h) behandelt, um Autophagie und dadurch eine Rekrutierung des endogenen LC3 an die Autophagosomen zu induzieren. Die Zellen wurden mit LysoTracker inkubiert um lysosomale Kompartimente anzufärben und anschließend fixiert. Autophagosomen bzw. Autolysosomen wurden parallel mit einem polyklonalen anti-LC3 Ziegen-Antikörper (1: 200) sowie einem polyklonalen anti-LC3 Kaninchen-Antikörper (LC3 K-AK; 1:300) angefärbt. Beide Antikörper detektieren die gleichen Strukturen. Unter diesen Bedingungen akkumulieren die Lysosomen perinukleär, zudem ist eine Überlappung der LysoTracker-markierten Kompartimente mit den LC3-positiven Autophagosomen/Autolysosomen zu sehen (vgl. mit Abbildung 16). Der untere Abbildungsteil zeigt eine vierfache Vergrößerung der gestrichelten Kästen. Die weiße Farbe im Überlagerungsbild zeigt die Kolokalisation der fluoreszenz-markierten Proteine an. Dargestellt sind konfokale Lasermikroskopiebilder ($n = 2$, Balken entspricht 50 μm). Diese Abbildung stammt aus der Publikation (Gohla *et al.*, 2007b).

4.1.4 Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von $G\alpha_{i3}$

Nach Validierung des Ziegenantikörpers zum Nachweis des Autophagosomenmarkers LC3 für die immunzytochemische Analyse autophagosomaler Strukturen in Maushepatozyten sollte im Folgenden die subzelluläre Lokalisation von $G\alpha_{i3}$ in diesem System untersucht werden. Abbildung 18 zeigt, dass die durch Nährstoffentzug induzierte Autophagie eine deutliche Umverteilung von $G\alpha_{i3}$ auslöste. Während $G\alpha_{i3}$ unter Nährstoff-reichen Kulturbedingungen (d. h. ohne Stimulation der basalen zellulären Autophagie) diffus im Zytosol verteilt war, akkumulierte $G\alpha_{i3}$ nach Induktion der Autophagie z. T. an die Plasmamembran sowie hauptsächlich an LC3-positive Autophagosomen (Abbildung 18 sowie Abbildung 20A). $G\alpha_{i3}$ scheint also mit subzellulären Kompartimenten assoziiert zu sein, die an den initialen Schritten der autophagischen Proteolyse involviert sind.

Der durch Hungerung induzierten Autophagie wirken Hormone wie z. B. Insulin und Nährstoffe wie z. B. Aminosäuren entgegen (Kadowaki *et al.*, 2006, Lavallard *et al.*, 2012). Daher wurde überprüft, ob Inhibitoren des autophagischen Prozesses einen Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von $G\alpha_{i3}$ haben. In Abbildung 18 ist gezeigt, dass Hepatozyten, in denen die Autophagie zunächst durch Nährstoffentzug stimuliert und anschließend durch Inkubation mit Insulin oder Phenylalanin inhibiert wurde, eine im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlich reduzierte LC3-Färbung aufwiesen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Inkubation der Hepatozyten mit Insulin/Phenylalanin zu einer effizienten Inhibierung der Autophagie führt. Interessanterweise wurde nach Inkubation der Zellen mit Insulin oder Phenylalanin nicht nur eine Reduktion von LC3-positiven Strukturen, sondern auch eine verminderte vesikuläre Lokalisation von $G\alpha_{i3}$ beobachtet (Abbildung 18). Während die Inkubation der Zellen mit Insulin zu einer verstärkten plasmamembranären Lokalisation von $G\alpha_{i3}$ führte, verursachte Phenylalanin eine merkliche Abflachung der Zellen und eine diffuse zytosolische Verteilung von $G\alpha_{i3}$, ähnlich wie in „ruhenden“, nicht gehungerten Zellen.

Durch die Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen entstehen die katabolisch aktiven Autolysosomen (Meijer & Codogno, 2006). Die Zugabe von zellpermeablen Proteaseinhibitoren ermöglicht es, unter experimentellen Bedingungen die lysosomalen Proteasen auch in Autolysosomen zu inhibieren. Somit können mit den (lytisch inaktivierten) Autolysosomen assoziierte, autophagosomale und lysosomale Markerproteine detektiert werden. Hepatozyten, in denen der autophagische Prozess stimu-

liert worden war, zeigten nach Behandlung mit Proteaseinhibitoren eine weitgehend überlappende Färbung von LC3 und $G\alpha_{i3}$ im (auto)lysosomalen Kompartiment (Abbildung 18, gehungerte Zellen). Diese Daten zeigen, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen viele Autophagosomen bereits mit Lysosomen fusioniert sind und demonstrieren eine Kolo-kalisierung von $G\alpha_{i3}$ mit LC3 auf Autophagosomen und Autolysosomen. Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die subzelluläre Lokalisation von $G\alpha_{i3}$ vom metabolischen Status der Zelle abhängt und wichtige Funktionen auf autophagosomalen Membranen ausübt.

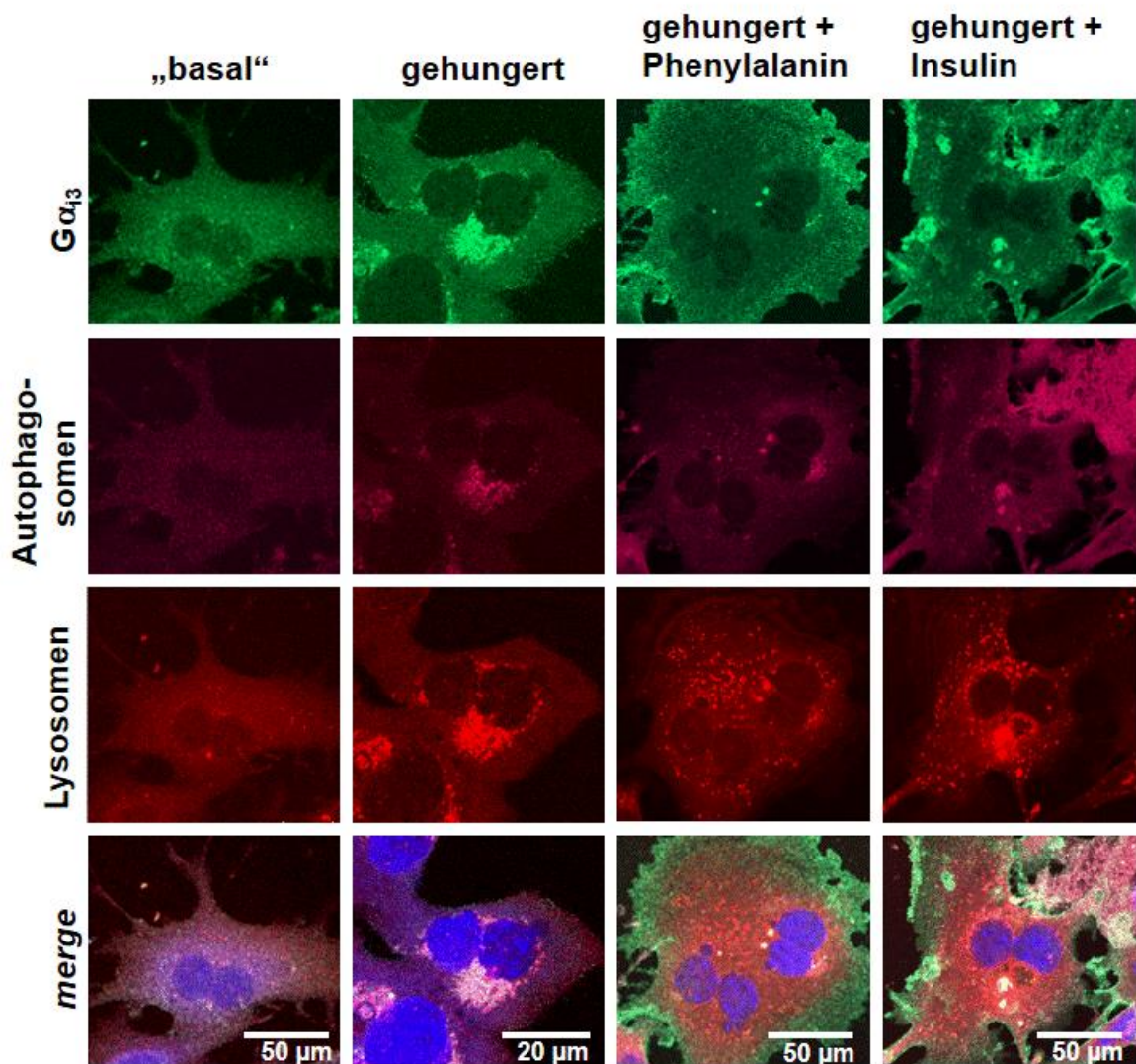


Abbildung 18. Die subzelluläre Lokalisation von $G\alpha_{i3}$ hängt vom zellulären metabolischen Status ab

Primäre Maushepatozyten wurden entweder in Kulturmedium („basal“) oder in einem Nährstoff-armem Medium (ohne Zusatz von Aminosäuren und Wachstumsfaktoren; „gehungert“) kultiviert. Die Induktion der Autophagie führte zu einer weitgehenden Kolo-kalisation von $G\alpha_{i3}$, dem Autophagosomenmarker LC3 und dem Lysosomenmarker LysoTracker. Um die autophagische Aktivität zu inhibieren, wurden die Zellen mit Insulin (10 nM für 60 Minuten) oder Phenylalanin (0,2 mM für 60 Minuten) behandelt. Dies führte zu einer Verminderung der LC3-positiven Autophagosomen und parallel zu einem Verlust von $G\alpha_{i3}$ im vesikulären Kompartiment, sowie in einer diffusen zytosolischen Verteilung der Lysosomen. Insulin induzierte eine Akkumulation von $G\alpha_{i3}$ in der Plasmamembran, wohingegen Phenylalanin zu einer diffusen zytosolischen Verteilung von $G\alpha_{i3}$ führte. Außerdem ist das charakteristische *ruffling* der Plasmamembran als Reaktion auf Insulin und eine Abflachung der Zellen als Reaktion auf Phenylalanin zu erkennen. Dargestellt sind konfokale Lasermikroskopiebilder ($n = 3$). Diese Abbildung stammt aus der Publikation (Gohla *et al.*, 2007b).

Nach Induktion der Autophagie akkumuliert $G\alpha_{i3}$ nicht nur teilweise an die Plasmamembran und den intrazellulären Vesikeln wie den LC3-positiven Autophagosomen, sondern teilweise auch mit spezifischen Markern des endoplasmatischen Retikulums und der frühen Endosomen (Abbildung 19).

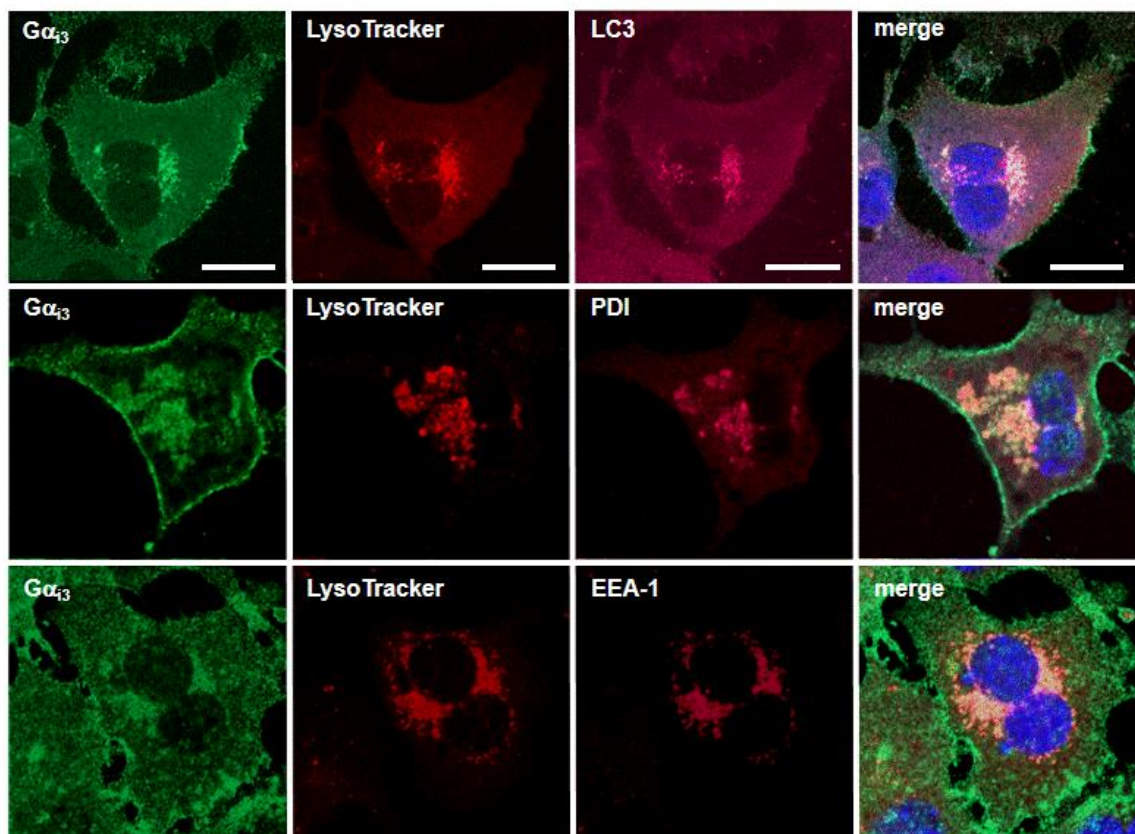


Abbildung 19. $G\alpha_{i3}$ lokalisiert an intrazelluläre Organellen nach Stimulation der Autophagie

Primäre Maushepatozyten wurden in einem Aminosäure- und Wachstumsfaktor-freien Medium kultiviert. Nach Induktion der Autophagie akkumuliert $G\alpha_{i3}$ sowohl z. T. an der Plasmamembran, als auch verstärkt an intrazellulären Vesikeln. Darüberhinaus kolokalisiert $G\alpha_{i3}$ nicht nur mit LC3-positiven Autophagosomen, sondern auch mit den Markern von intrazellulären Organellen, wie dem early endosomal antigen-1 (EEA-1) und der Proteindisulfidisomerase (PDI). Die Zellen wurden vor der Fixierung und Färbung 30 Minuten mit LysoTracker behandelt um die Lysosomen anzufärben. Folgende Antikörper wurden für die Detektion der verschiedenen Organellen verwendet: anti-LC3 Ziegen-Antikörper (für Autophagosomen), LysoTracker (für Lysosomen und andere saure Organellen), early endosomal antigen-1 (EEA-1; für frühe Endosomen) und Proteindisulfidisomerase (PDI; für das raue endoplasmatische Retikulum). Dargestellt sind konfokale Lasermikroskopiebilder ($n = 3$, Balken entspricht $20\ \mu\text{m}$). Diese Abbildung stammt aus der Publikation .(Gohla *et al.*, 2007b)

4.1.5 Die Bildung von LC3-positiven Vesikeln ist $G\alpha_{i3}$ -abhängig

In den vorhergehenden Abschnitten wurde die Kolokalisation von $G\alpha_{i3}$ an intrazelluläre Organellen gezeigt. Darüberhinaus zeigte sich eine vom metabolischen Zustand der Zelle abhängige, dynamische Lokalisation von $G\alpha_{i3}$ an das autophagosomale Kompartiment. Codogno und Mitarbeiter konnten in ihren Arbeiten an der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 zeigen, dass ein $G\alpha_{i3}$ -abhängiger Mechanismus den Membranflux aus Kompartimenten wie dem endoplasmatischen Retikulum zur Bildung von sequestrierenden Membranen reguliert (Ogier-Denis *et al.*, 1995). In Abbildung 20A ist zu sehen, dass der Nachweis von LC3 auf LysoTracker-positiven endosomalen Strukturen in $G\alpha_{i3}$ -defizienten Hepatozyten im Vergleich zu den wildtypischen Hepatozyten drastisch reduziert ist. Interessanterweise war eine vesikuläre Akkumulation von LC3 nach Induktion der zellulären Autophagie in $G\alpha_{i3}$ -defizienten Hepatozyten immunozytochemisch nicht mehr detektierbar. Auf Proteinebene zeigt der Western-Blot von Hepatozytenlysaten, dass die Prozessierung des LC3 von der zytosolisch lokalisierten LC3-I-Form, welche unter Nährstoff-reichen Bedingungen (Standardmedium „Ktrl“) vorkommt in die LC3-II-Form, welche bei Induktion der Autophagie in Nährstoff-armen Bedingungen („HBSS“) mit der Autophagosomen-Membran verankert ist, in Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$ beeinträchtigt zu sein (Abbildung 20B).

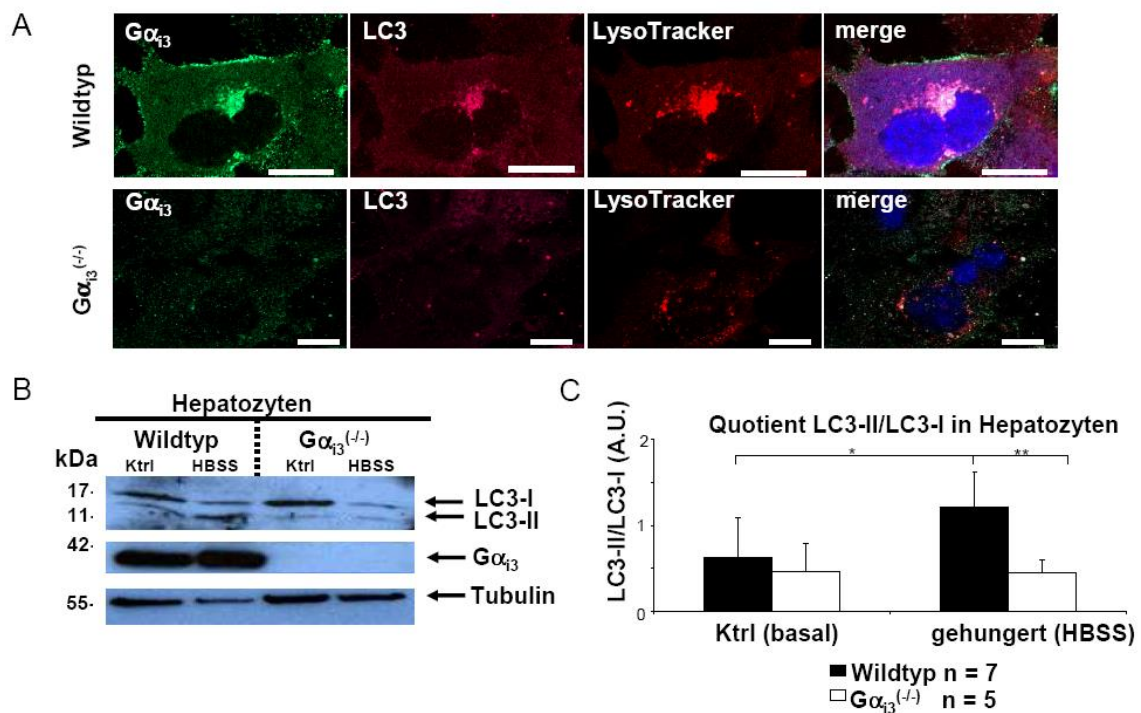


Abbildung 20. $G\alpha_{i3}$ beeinflusst die Bildung von LC3-II-positiven Vesikeln

(A) Wildtyp und $G\alpha_{i3}$ -defiziente Hepatozyten wurden für zwei Stunden in HBSS in Gegenwart von Protease-Inhibitoren gehungert. Die kumulative Autophagie wurde durch das Anfärben von Autophagosomen mit dem anti-LC3 Ziegen-Antikörper (1:200) und dem Anfärben von Lysosomen mit LysoTracker visualisiert. In gehungerten Zellen lokalisiert $G\alpha_{i3}$ sowohl an die Plasmamembran als auch auf LC3-positive Autophagosomen, die z. T. mit Lysosomen überlappen. Die Akkumulation von LC3-positiven Autophagosomen ist in $G\alpha_{i3}$ -defizienten Zellen stark reduziert. Dargestellt sind konfokale Laserмикроскопиеbilder ($n = 3$, Balken entsprechen jeweils 20 μ m). Diese Abbildung stammt aus der Publikation (Gohla *et al.*, 2007b). (B) Kumulative Autophagie wurde mittels Immunoblotting analysiert. Hierzu wurden Ganzzell-Lysate über SDS-PAGE unter Verwendung eines 12%igen Acrylamidgels aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und mit den spezifischen Antikörpern gegen $G\alpha_{i3}$ (1:5000) bzw. LC3 (1:4000) detektiert. Wildtyp (Wt) bzw. $G\alpha_{i3}$ -defiziente Hepatozyten wurden in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren in HBSS gehungert (HBSS) oder in Nährstoffreichem Kulturmedium (Ktrl) gehalten. Eine Ladungskontrolle des Gels wurde mit einem Antikörper gegen Tubulin durchgeführt ($n = 5$). (C) Densitometrische Auswertung des Quotienten von LC3-II zu LC3-I in Hepatozyten. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SD (Wildtyp Kontrolle: 0,63 \pm 0,45; Wildtyp „HBSS“: 1,21 \pm 0,41; $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Kontrolle: 0,46 \pm 0,32; $G\alpha_{i3}^{-/-}$ „HBSS“: 0,44 \pm 0,15) von sieben bzw. fünf unabhängigen Versuchen. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Student t-Test ermittelt. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,005$. A.U. arbitrary units. Diese Daten zeigen eine beeinträchtigte Prozessierung der zytosolischen Form (LC3-I) in die Autophagosomenmembran-assoziierte Form (LC3-II) in Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$ und deuten auf eine Rolle von $G\alpha_{i3}$ bei der Bildung von Autophagosomen hin.

Diese beeinträchtigte Prozessierung der zytosolischen Form (LC3-I) in die Autophagosomenmembran-assoziierte Form (LC3-II) in Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$ wurde densitometrisch ausgewertet und zeigt eine statistische Signifikanz (Abbildung 20C). Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass $G\alpha_{i3}$ im Rahmen der Autophagosomen-Bildung eine wesentliche Rolle einnimmt.

4.1.6 Biochemischer Nachweis von $G\alpha_{i3}$ in autophagosomalen Membranen

In Abschnitt 4.1.4 wurde die Kollokalisierung von $G\alpha_{i3}$ mit hepatozytären Autophagosomen in Immunofluoreszenzfärbungen dargestellt. Um zu überprüfen, ob diese Kollokalisierung auf einer Assoziation von $G\alpha_{i3}$ mit autophagischen Vesikeln beruht, wurden biochemische Fraktionierungsexperimente mit Mausembryonalfibroblasten bzw. isolierten Maushepatozyten zur Analyse verschiedener subzellulärer Kompartimente durchgeführt. Hierzu wurden die MEFs bzw. isolierten Maushepatozyten lysiert und die Organellen mittels eines diskontinuierlichen Dichtegradienten aufgetrennt (modifiziert in Anlehnung an die Methode von Seglen und Mitarbeitern; siehe auch Methoden, Kapitel 3.2.3.5). Um Autophagosomen in den Zellen anzureichern, wurden die Maushepatozyten bzw. MEFs zwei Stunden lang in Nährstoff-armen Medium mit den Zusätzen Leupeptin und Vinblastin inkubiert. Hierbei verhindert Leupeptin den letzten Schritt in der Autophagie – den Abbau des Autolysosoms, während Vinblastin an das Protein Tubulin bindet und die Fusion von Autophagosomen mit endosomalen und lysosomalen Kompartimenten verhindert (siehe Methoden, Kapitel 3.2.3.5).

Anschließend werden die Zellen in einem Sucrose-Puffer aufgenommen und homogenisiert. Nach der selektiven Entfernung der Lysosomen wurden die Autophagosomen nach mehreren Zentrifugationsschritten in der Fraktion „F2“ angereichert. Diese Fraktion sowie die leichtere, Plasmamembran-angereicherte „F1“ Fraktion wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran geblottet und die Fraktionen mit Organell-spezifischen Antikörpern charakterisiert (Stromhaug *et al.*, 1998). Eine schematische Übersicht über die subzelluläre Fraktionierung von Autophagosomen gibt Abbildung 21 wieder.

Die Immunoblot-Analyse der MEFs-Fraktionierung zeigt (Abbildung 22), dass erwartungsgemäß sowohl $G\alpha_{i3}$ als auch $G\alpha_{i2}$ in der Plasmamembran-angereicherten Fraktion (Plasmamembran Marker: E-Cadherin) zu finden waren. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Immunfluoreszenz-Analyse wurde darüber hinaus $G\alpha_{i3}$, nicht aber $G\alpha_{i2}$ in der LC3-positiven, mit autophagischen Vesikeln angereicherten Fraktion F2 detektiert (Abbildung 22). Die Anwesenheit von Golgi- (GM130), endoplasmatisches Retikulum (PDI)- sowie Mitochondrien-spezifischen (Cytochrom C) Markerproteinen in der autophagosomalen Fraktion spiegelt wahrscheinlich von Autophagosomen sequestriertes zelluläres Material wider. Die Ergebnisse zeigen, dass

G α_{i3} sowohl auf der Plasmamembran als auch zusammen mit LC3 in der autophagosomalen Fraktion angereichert ist.

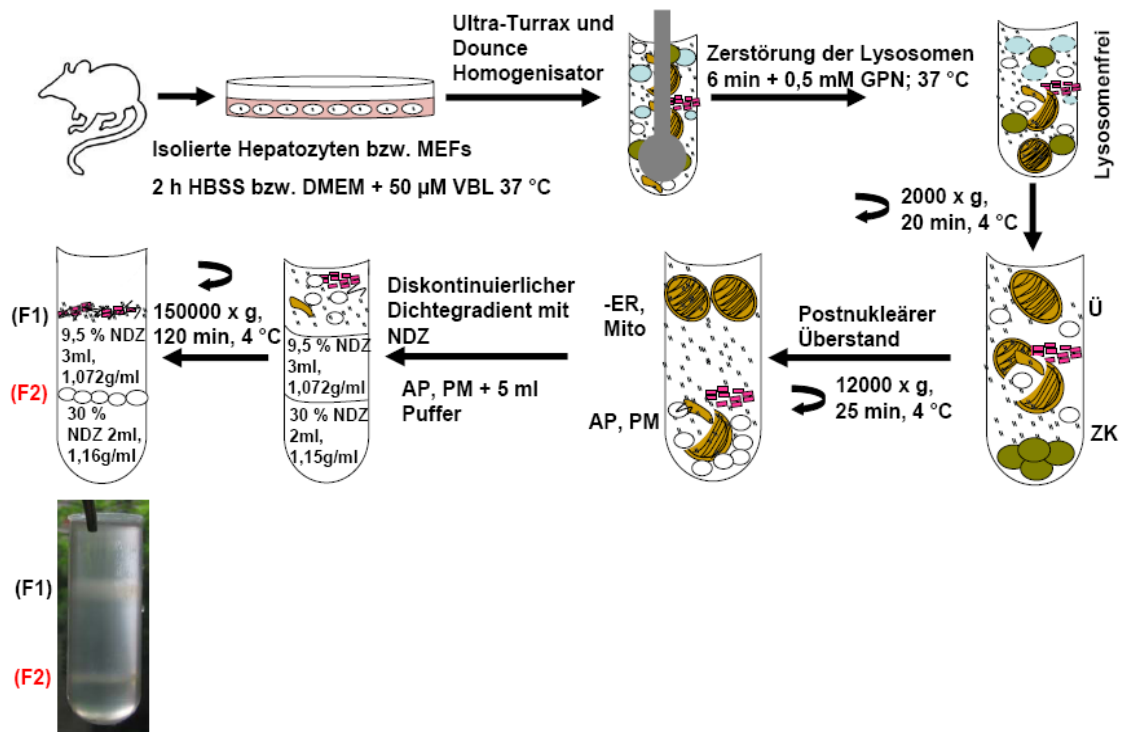


Abbildung 21. Schema der Autophagosomenisolierung

HBSS, *Hanks buffered saline solution*; VBL, Vinblastin; GPN, Glycin-Phenyl- β -Naphtylamid; Lys, Lysosomen; Ü, postnukleärer Überstand; ZK, Zellkerne; ER, endoplasmatisches Retikulum-angereicherte Fraktion; Mito, Mitochondrien; AP, Autophagosomen; PM, Plasmamembran; NDZ, Nycodenz; F1, Plasmamembran-angereicherte Fraktion; F2, Autophagosomen-angereicherte Fraktion. Experimentelle Details sind im Methodenteil (siehe Methoden, Kapitel 3.2.3.5) zu finden.

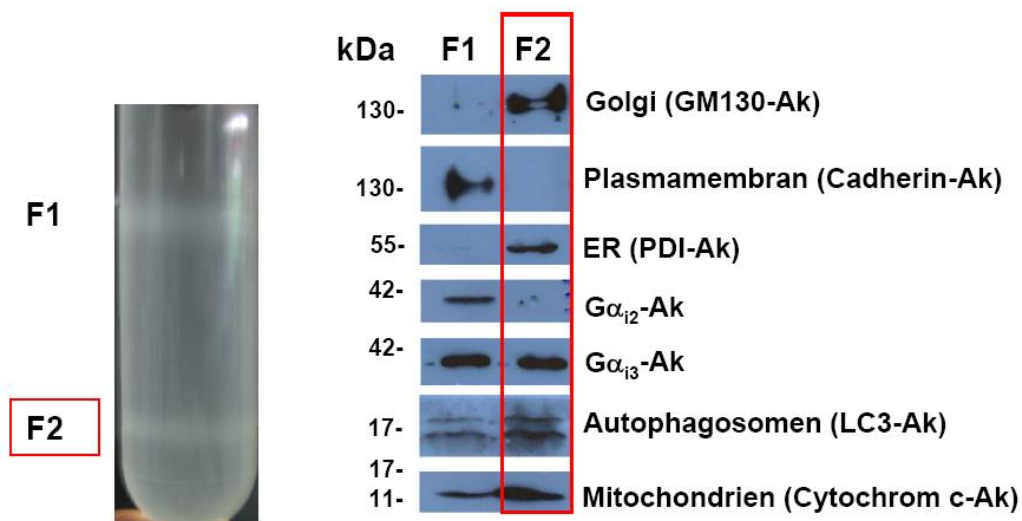


Abbildung 22. $G\alpha_{i3}$ kofraktioniert mit Autophagosomen aus Mausembryonalfibroblasten

Um Autophagie zu induzieren, wurden die MEFs zwei Stunden „gehungert“. Links: Mit einer subzellulären Fraktionierung wurden die verschiedenen Organellen isoliert (siehe Methoden, Kapitel 3.2.3.5 sowie das Übersichtsschema in Abbildung 21). Rechts: Die Membranfraktionen wurden in Lämmli-puffer solubilisiert, über SDS/PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose-Membran gebロットet und mit organellspezifischen Antikörpern (Cytochrom c 1:4000; PDI 1:1000; GM130 1:250; LC3 1:4000; Cadherin 1:1000; $G\alpha_{i3}$ 1:5000, $G\alpha_{i2}$ 1:1000) inkubiert. $G\alpha_{i3}$, nicht aber $G\alpha_{i2}$, ist sowohl in der Plasmamembranfraktion (F1), als auch in der Autophagosomen-angereicherten Fraktion F2 nachweisbar.

4.1.7 Funktion von $G\alpha_{i3}$ in mTOR-medierte Signalwegen

Die Insulin- und Aminosäure-abhängige Regulation der Autophagie wird durch Signaltransduktionswege mediert, welche über die Serin/Threonin-Kinase *mammalian target of rapamycin* (mTOR) gesteuert werden (siehe Einleitung, Kapitel 1.3.4.4). Bei ausreichender Menge an Nährstoffen erfolgt eine Phosphorylierung von mTOR an Ser²⁴⁴⁸ über den PI3-Kinase/Akt-Signalweg. Diese Aktivierung von mTOR führt zur Inhibition der autophagischen Proteolyse. Andererseits kann die Aktivität von mTOR durch Rapamycin gehemmt werden, daher führt die Inhibition mit Rapamycin zu einer Induktion der Autophagie. In den vorherigen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass $G\alpha_{i3}$ in Abhängigkeit vom metabolischen Status der Zellen auf autophagosomalen Endomembranen lokalisiert ist, und dass der Verlust von $G\alpha_{i3}$ zu einer starken Reduktion der LC3-Expression führt. In Abbildung 23 ist zu sehen, dass $G\alpha_{i3}$ nach Hungerung-induzierter Autophagie an die Plasmamembran und an autophagosomale Vesikel lokalisiert. Werden die Hepatozyten jedoch 18 Stunden lang mit dem mTOR-Kinaseinhibitor Rapamycin behandelt, wurde die Autophagie zwar stimuliert (gezeigt

durch die Akkumulierung LC3-positiver Vesikel; Abbildung 23), jedoch konnte keine Assoziation von $G\alpha_{i3}$ mit autophagischen Vesikeln oder mit der Plasmamembran nachgewiesen werden. Zudem zeigt eine erste präliminäre Versuchsserie, dass die durch Rapamycin induzierte Autophagie und die damit verbundene Prozessierung der zytosolischen LC3-I-Form zur Membran-assoziierten LC3-II-Form in $G\alpha_{i3}$ -defizienten Hepatozyten beeinträchtigt ist (Abbildung 24). Diese Daten zeigen eine mögliche Rolle von $G\alpha_{i3}$, die signalaufwärts oder auf der gleichen Ebene von mTOR zu liegen scheint.

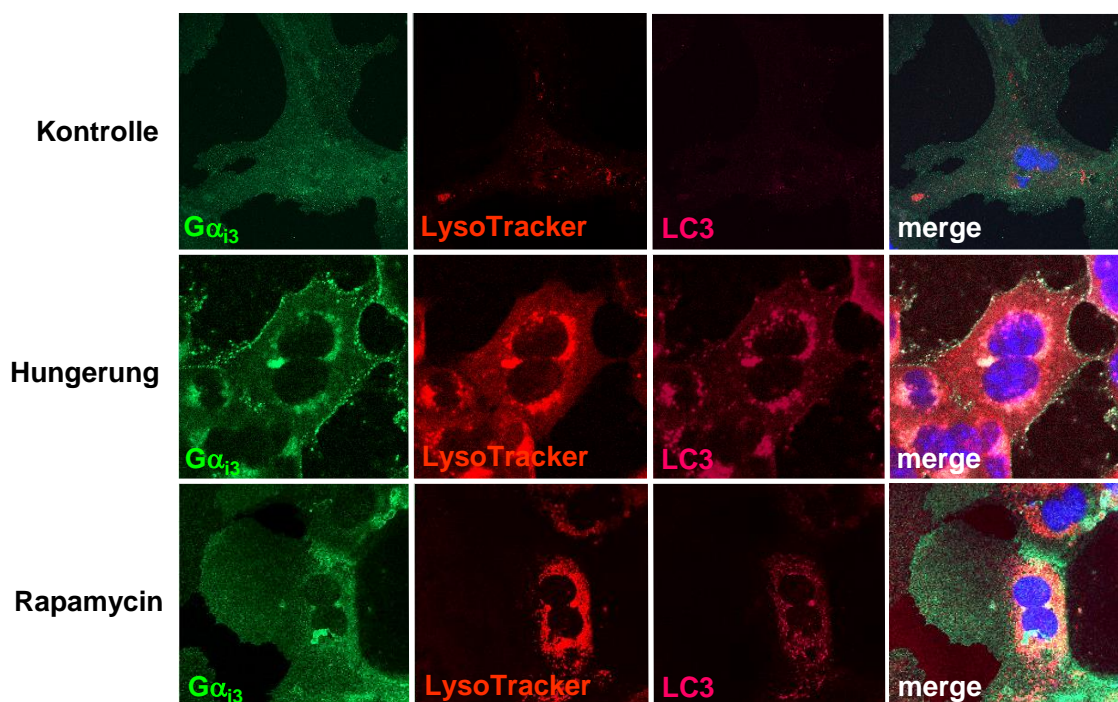


Abbildung 23. Die Aktivität von mTOR beeinflusst die subzelluläre Lokalisation von $G\alpha_{i3}$
Primäre Wildtyp-Maushepatozyten wurden entweder in Kulturmedium („Kontrolle“), 2 h in einem Aminosäure- und Wachstumsfaktoren-entzogenem Medium („Hungerung“) oder in Kulturmedium mit Rapamycin (18 h, 200 nM) in Anwesenheit von Proteaseinhibitoren kultiviert. Autophagische Aktivität wurde durch das Anfärben von Autophagosomen mit dem Ziege anti-LC3 Antikörper und von Lysosomen mit LysoTracker sichtbar gemacht. Im Gegensatz zur subzellulären Lokalisation von $G\alpha_{i3}$ unter „Hungerungsbedingungen“ transloziert $G\alpha_{i3}$ nach einer Behandlung der Hepatozyten mit Rapamycin nicht an die Plasmamembran oder an Autophagosomen. Dargestellt sind repräsentative konfokale Lasermikroskopiebilder ($n = 3$).

Um den Effekt von $G\alpha_{i3}$ auf die Nährstoff- und Aminosäure-abhängige Regulierung der mTOR-Aktivität zu untersuchen, wurden Wildtyp und $G\alpha_{i3}$ -defiziente Hepatozyten entweder zwei Stunden lang in Williams E Medium oder in dem Aminosäure- und Wachstumsfaktor-freien HBSS-Medium kultiviert. Durch Immunoblotting der ca. 290 kDa-schweren mTOR-Kinase und der Verwendung eines phosphospezifischen polyklonalen Kaninchen Antikörpers, der die Aktivierungs-spezifische mTOR Serin²⁴⁴⁸-Phosphorylierung erkennt, konnte ein Unterschied in der Aktivierung von mTOR in Wildtyp- und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Zellen detektiert werden (Abbildung 25 A).

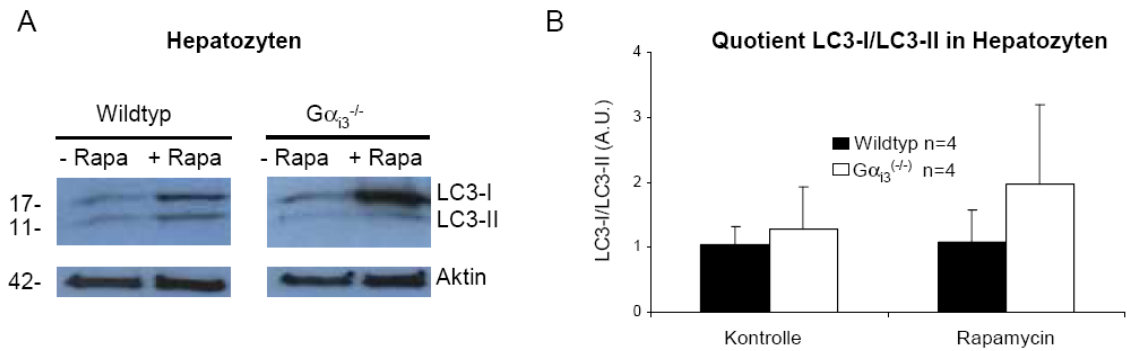


Abbildung 24. Die Rapamycin-induzierte autophagische Proteolyse sowie die Prozessierung von LC3-I zu LC3-II scheint abhängig von $G\alpha_{i3}$ zu sein

(A) Wildtypische oder $G\alpha_{i3}$ -defiziente Maushepatozyten wurden in Anwesenheit von Rapamycin (200 nM, 21-stündige Inkubation; „+Rapa“) oder in Abwesenheit von Rapamycin (William E Kulturmedium; „-Rapa“) in Gegenwart von Proteaseinhibitoren kultiviert. Ganzzell-Lysate (18 μ g Protein pro Spur) wurden über SDS-PAGE unter Verwendung eines 15%igen Acrylamidgels aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrozellulose mit dem LC3-spezifischen Antikörper (1:4000) analysiert. (B) Densitometrische Auswertung des Quotienten von LC3-I zu LC3-II in Hepatozyten. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SD (Wildtyp Kontrolle: $1,04 \pm 0,29$; Wildtyp Rapamycin: $1,09 \pm 0,49$; $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Kontrolle: $1,29 \pm 0,64$; $G\alpha_{i3}^{-/-}$ Rapamycin: $1,97 \pm 1,21$) von vier unabhängigen Versuchen. Mittelwerte: A.U. arbitrary units. Diese präliminären Daten zeigen, dass die Prozessierung der zytosolischen Form (LC3-I) in die Autophagosomenmembran-assoziierte Form (LC3-II) in Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$ beeinträchtigt zu sein scheint.

Abbildung 25 B zeigt die densitometrische Auswertung des Verhältnisses von Serin²⁴⁴⁸-phosphoryliertem mTOR (phospho-mTOR) zum mTOR Gesamtsignal in nicht gehungerten Kontroll-Hepatozyten und in gehungerten Hepatozyten. In $G\alpha_{i3}$ -defizienten Hepatozyten konnte unter Standard-Kulturbedingungen eine erhöhte Serin²⁴⁴⁸-Phosphorylierung von mTOR beobachtet werden.

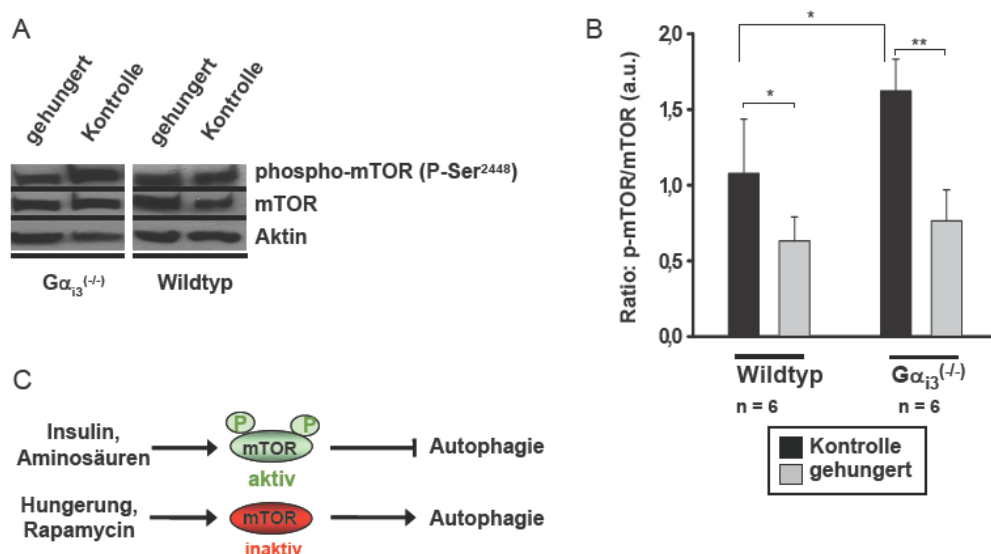


Abbildung 25. Die Aktivierung von mTOR ist bei Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$ dysreguliert

(A) Wildtyp- oder $G\alpha_{i3}$ -defiziente Maushepatozyten wurden entweder in Nährstoff-reichem Kulturmedium (Kontrolle) oder für 2 h in HBSS kultiviert. Ganzzell-Lysate (10 μ g) wurden über SDS-PAGE unter Verwendung eines 7%igen Acrylamidgels aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrozellulose übertragen und mit dem spezifischen Antikörper gegen phosphoryliertes mTOR (P-Ser²⁴⁴⁸; 1:1000) bzw. gegen Gesamt-mTOR (1:1000) analysiert. (B) Densitometrische Auswertung der P-Ser²⁴⁴⁸ und Gesamt-mTOR Western blots. Dargestellt ist der Quotient aus Ser²⁴⁴⁸-phosphoryliertem, aktiven mTOR (p-mTOR) zu Gesamt-mTOR. Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SD aus sechs unabhängigen Versuchen. Statistische Signifikanz wurde mit dem Student t-Test ermittelt. *, **, signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Kontrolle; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$. A.U. arbitrary units. (C) Schematische Darstellung der durch mTOR regulierten autophagischen Proteolyse.

Da die Autophagie durch eine erhöhte Aktivierung (Serin²⁴⁴⁸-Phosphorylierung) des mTOR-Kinase-Komplexes negativ reguliert wird, deuten diese Experimente darauf hin, dass $G\alpha_{i3}$ auch eine Funktion in der durch mTOR-regulierten Autophagie besitzt.

Die in dieser Dissertationsarbeit bisher beschriebenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass $G\alpha_{i3}$ eine Funktion in der Regulation der autophagischen Aktivität der Leber haben könnte. Da die Regulation der autophagischen Aktivität wichtig für die Selbstregulation und das Gleichgewicht im Organismus ist, sollte im zweiten Teil dieser Arbeit eine Charakterisierung von $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen hinsichtlich möglicher Unterschiede im Verhalten und der physiologischen Merkmale jeweils im Vergleich zu wildtypischen Tieren vorgenommen werden.

4.2 Charakterisierung von $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen

4.2.1 Genotypische Verteilung von Mäusen aus $G\alpha_{i2}^{(+/-)}/G\alpha_{i3}^{(+/-)}$ -Kreuzungen

Die bisherigen Ergebnisse der vorhergehenden Kapitel lassen auf eine wichtige Rolle von $G\alpha_{i3}$ u. a. während der autophagischen Proteolyse schließen – zeigen sich hier Veränderungen im Phänotyp? Unsere Untersuchungen zeigen, dass $G\alpha_{i3}$ -defiziente Tiere mit Mendel'scher Frequenz geboren werden und fertil und viabel sind (Gohla *et al.*, 2007b). Konstitutiv $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse fallen durch keinen offensichtlichen akuten Phänotyp auf. Es gibt jedoch Befunde die auf kraniofaziale und andere Skelettmissbildungen hin deuten, die mit einer Funktion für $G\alpha_{i3}$ in der Neuralleiste und in Somiten im Einklang stehen (Plummer *et al.*, 2012).

Während Tiere mit konstitutiven Einzeldelationen der $G\alpha_i$ -Isoformen lebensfähig sind, zeigt ein vollständiger Verlust der peripheren G_i -Proteine in $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ -doppeldefizienten Mäusen eine Letalität im frühen, embryonalen Stadium (siehe Abbildung 26). Hierbei scheint die Anwesenheit eines einzelnen aktiven Allels

von $G\alpha_{i3}$ für die embryonale Entwicklung ausreichend zu sein, während mindestens ein Allel des $G\alpha_{i2}$ -Proteins für das extrauterine Überleben notwendig ist. Die Tatsache, dass der Verlust beider peripherer $G\alpha_i$ -Proteine letal ist, unterstützt die Hypothese, dass $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ unter bestimmten Umständen redundante Funktionen erfüllen können und der Verlust einer Isoform *in vivo* durch Hochregulation der anderen Isoform kompensiert werden kann.

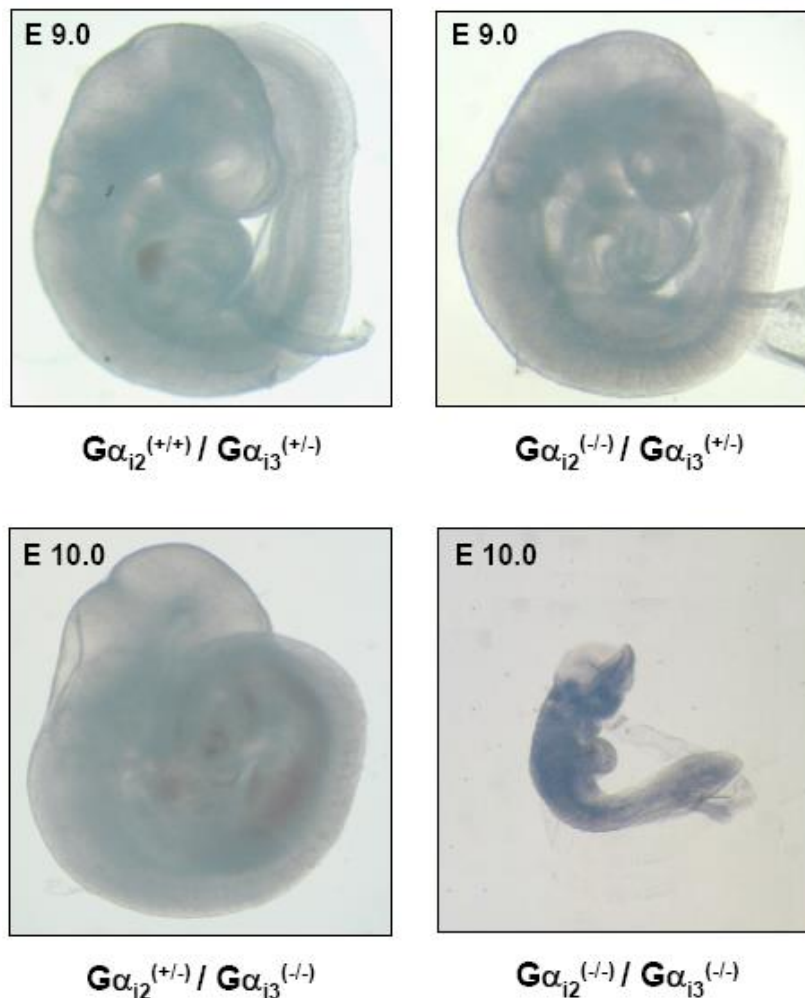


Abbildung 26. Morphologie von $G\alpha_{i2}$ -/ $G\alpha_{i3}$ -deletierten Embryonen

Die Abbildung gibt die Morphologie von $G\alpha_{i2}$ -/ $G\alpha_{i3}$ -deletierten Embryonen an Tag 9 und 10 (E 9.0 und E 10.0) wieder. Gezeigt sind Seitenansichten von defizienten Embryonen mit einem aktiven Allel von $G\alpha_{i3}$ (oben links) verglichen mit Embryonen die ein Allel von $G\alpha_{i3}$ (oben rechts) oder von $G\alpha_{i2}$ (unten links) aufweisen. Ein Allel von $G\alpha_{i3}$ oder $G\alpha_{i2}$ ist notwendig für die Embryonalentwicklung bis E 9/E 10. Im Gegensatz dazu zeigen $G\alpha_{i2}$ / $G\alpha_{i3}$ -doppeldefiziente Embryonen eine massive Entwicklungsstörung am Tag E 10 (unten rechts). Diese Abbildung stammt aus der Publikation (Gohla *et al.*, 2007b).

Um die genspezifischen Merkmale zwischen den peripheren $G\alpha_i$ -Isoformen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ zu unterscheiden, wurden in unserem Labor homo- oder heterozygote $G\alpha_{i2}$ -

und/oder $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse gekreuzt und die Nachkommen untersucht. In Tabelle 10 ist gezeigt, dass weniger $G\alpha_{i2}$ -defiziente Mäuse geboren wurden als die erwartete Mendel'sche Frequenz (Gohla *et al.*, 2007b) und 50 % der Tiere bis zum Zeitpunkt des Absetzens versterben (Gohla *et al.*, 2007b, Rudolph *et al.*, 1995). Im Gegensatz dazu werden $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse in erwarteter Häufigkeit nach Mendel geboren (Tabelle 13 bis 16 im Anhang). Eine Doppeldefizienz von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ resultiert in einer massiven Wachstumshemmung und Letalität bis Tag 10 (E 10) der Embryonalentwicklung. Die Anwesenheit nur eines Allels von $G\alpha_{i3}$ in $G\alpha_{i2}^{(-/-)}/G\alpha_{i3}^{(+/-)}$ -Embryonen ist hingegen ausreichend für die Entwicklung und das Überleben bis zur Geburt, die Mäuse sterben jedoch perinatal. Die Anwesenheit von $G\alpha_{i2}$ in $G\alpha_{i2}^{(+/-)}/G\alpha_{i3}^{(-/-)}$ -Mäusen ist notwendig für das Überleben bis zur neonatalen Periode. Abbildung 26 zeigt repräsentativ $G\alpha_{i2}$ -/ $G\alpha_{i3}$ -defiziente Embryonen am Tag 9 bzw. Tag 10 (E 9.0 und E 10.0) der Embryonalentwicklung. Diese Daten bestätigen die Hypothese, dass $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ eine überlappende Funktion ausüben, deuten aber auch auf die Existenz von $G\alpha_{i2}$ - bzw. $G\alpha_{i3}$ -spezifischen Funktionen hin.

Tabelle 10: Genotypische Verteilung von Mäusen (C57BL/6) aus $G\alpha_{i2}^{(+/-)}/G\alpha_{i3}^{(+/-)}$ -Kreuzungen

Genotyp	*E 9.0	E 10.0 [†]	P 1- P 2 [‡]	P 21 [§]	Erwartete Verteilung nach Mendel
$G\alpha_{i2}^{(+/+)} / G\alpha_{i3}^{(+/+)}$	0	0	4	11,7 % (83)	6,25 %
$G\alpha_{i2}^{(+/-)} / G\alpha_{i3}^{(+/+)}$	0	3	11	19,2 % (137)	12,5 %
$G\alpha_{i2}^{(-/-)} / G\alpha_{i3}^{(+/+)}$	1	2	2	2,1 % (15)	6,25 %
$G\alpha_{i2}^{(+/+)} / G\alpha_{i3}^{(+/-)}$	1	1	5	19,7 % (140)	12,5 %
$G\alpha_{i2}^{(+/+)} / G\alpha_{i3}^{(-/-)}$	0	2	4	8,4 % (60)	6,25 %
$G\alpha_{i2}^{(+/-)} / G\alpha_{i3}^{(+/-)}$	1	3	10	34,7 % (247)	25 %
$G\alpha_{i2}^{(-/-)} / G\alpha_{i3}^{(+/-)}$	1	2	4	0 % (0)	12,5 %

Genotyp	*E 9.0	E 10.0 [†]	P 1- P 2 [‡]	P 21 [§]	Erwartete Verteilung nach Mendel
$G\alpha_{i2}^{(+/-)}/G\alpha_{i3}^{(-/-)}$	1	3	11	4,2 % (30)	12,5 %
$G\alpha_{i2}^{(-/-)}/G\alpha_{i3}^{(-/-)}$	1	1	0	0 % (0)	6,25 %

Die Anzahl der Tiere ist in Klammern gesetzt.

* Untersucht wurden insgesamt sechs Föten am Tag 9 der Embryonalentwicklung (E 9.0).

† Untersucht wurden insgesamt 17 Föten am Tag E 10.0.

‡ Untersucht wurden 51 tote neugeborene Mäuse, die innerhalb von zwei Tagen nach der Geburt (P 1–P 2) gefunden wurden.

§ Untersucht wurden insgesamt 712 (330 männliche und 382 weibliche) Mäuse aus 167 Würfen am postnatalen Tag 21 (P 21). Aus (Gohla *et al.*, 2007b).

4.2.2 Konditionstest

In der vorliegenden Arbeit wurde der Schwimmtest (*Forced Swim Test*) als Verhaltenstest eingesetzt, um die Kondition bzw. die physische Aktivität von weiblichen und männlichen $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen mit wildtypischen Kontrolltieren zu vergleichen (siehe Methoden, Kapitel 3.2.4.1). Dazu wurden die Mäuse (Stamm Sv129) in ein kleines Wasserbecken gesetzt und ihre physische Aktivität per Zeitmessung quantifiziert (aktives Schwimmen *versus* passives Treiben). Alle Messungen erfolgten an Tieren vergleichbaren Alters und Gewichts und in der nachtaktiven Phase der Tiere (17 – 20 Uhr). Die Ergebnisse der Schwimmversuche sind als Immobilitätszeit graphisch dargestellt (Abbildung 27). Die Immobilitätszeit ist bei $G\alpha_{i3}$ -defizienten weiblichen Mäusen ($G\alpha_{i3}^{-/-}$ ♀ n = 9; 142 Sekunden) im Vergleich zu weiblichen wildtypischen Mäusen (Wt ♀ n = 10; 108 Sekunden) signifikant verlängert. Auch bei den männlichen Mäusen zeigte sich eine längere Immobilität bei den $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen als bei den Wildtyp-Tieren. So lag die Immobilitätszeit bei den $G\alpha_{i3}$ -defizienten Tieren mit 178 Sekunden ($G\alpha_{i3}^{-/-}$ ♂ n = 8) signifikant höher als bei den Wildtyp-Tieren mit 114 Sekunden (Wt ♂ n = 10).

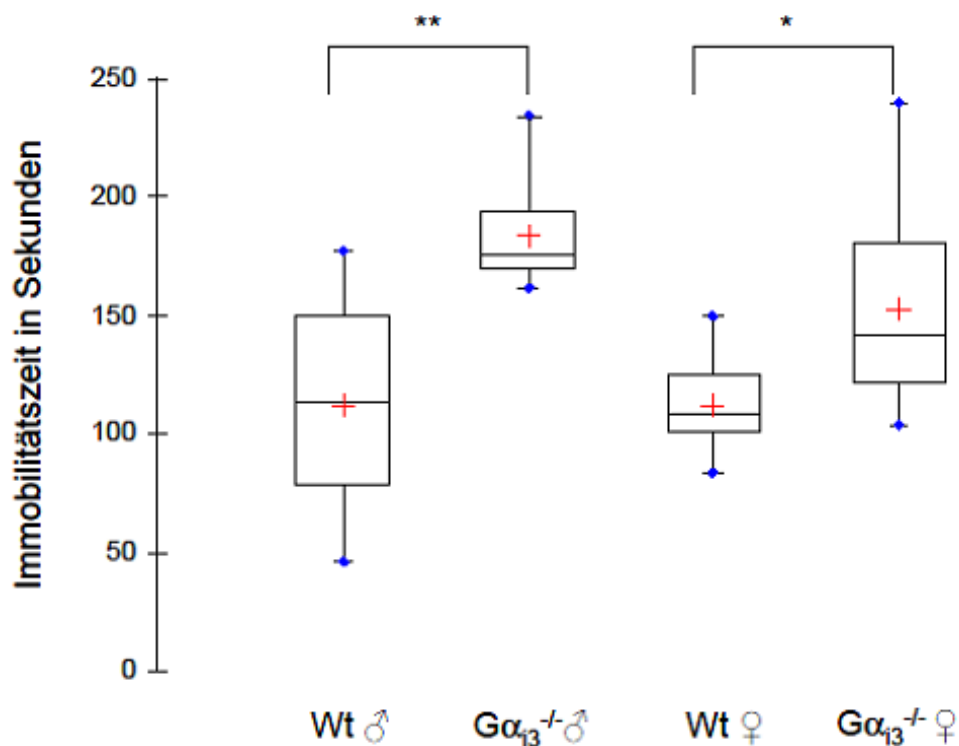


Abbildung 27. $G\alpha_{13}$ -defiziente Mäuse zeigen im Schwimmverhalten eine höhere Immobilität

Die Immobilitätszeit von weiblichen bzw. männlichen Wildtyp-Mäusen (Wt ♀ n = 10 bzw. Wt ♂ n = 10) wurde mit der Immobilitätszeit von weiblichen bzw. männlichen $G\alpha_{13}$ -defizienten Mäusen ($G\alpha_{13}^{-/-}$ ♀ n = 9 bzw. $G\alpha_{13}^{-/-}$ ♂ n = 8) verglichen. Die Versuchsdauer betrug insgesamt sechs Minuten, von denen die letzten vier Minuten aufgezeichnet und ausgewertet wurden. Die Messungen erfolgten während der nachtaktiven Phase der Tiere (17 – 20 Uhr). Die Werte sind als Kastengrafik (box plots) mit dem Median und der 25./75.-Perzentile dargestellt. Zusätzlich sind die Mittelwerte als rote Kreuze und die Minimal- und Maximalwerte als blaue Punkte der entsprechenden Datenreihe dargestellt. Statistische Signifikanz wurde mit dem Mann-Whitney U-Test ermittelt. *, **, signifikant unterschiedlich zur jeweiligen Wt-Kontrolle; * p < 0,05; ** p < 0,01.

4.2.3 Langzeitbeobachtung von $G\alpha_{13}$ -defizienten versus Wildtyp-Mäusen

Störungen der autophagischen Proteolyse haben schwerwiegende Entwicklungsdefekte zur Folge und scheinen eine Rolle bei Tumoren, neurodegenerativen Erkrankungen aber auch bei Alterungsprozessen zu haben (Madeo *et al.*, 2010, Rubinsztein *et al.*, 2011). Es gibt Untersuchungen die belegen, dass eine gestörte Autophagie mit einer verkürzten Lebensdauer einhergeht (Lapierre *et al.*, 2011, Morselli *et al.*, 2011, Morselli *et al.*, 2009, Rubinsztein *et al.*, 2011). Das Ziel dieser Studie war es deshalb, die Lebensdauer sowie weitere phänotypische Merkmale von C57BL/6-Wildtyp- und C57BL/6- $G\alpha_{13}$ -defizienten Mäusen unter kontrollierten,

keimarmen Bedingungen zu analysieren. Für diese Studie wurden 40 Wildtyp-Mäuse und 40 konstitutiv $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse, davon jeweils 20 männliche und 20 weibliche Tiere, über einen Zeitraum von über zwei Jahren in einem Überdruckisolator beobachtet. Diese Mäuse (C57BL/6; Stamm 1004) besaßen eine definierte Keimflora, die über eine hygienische Sanierung mittels Embryonentransfer in eine SPF (*specific-pathogen-free*)-Haltung erfolgte. Die Analyse der verstorbenen Tiere umfasste die Untersuchung der Blutwerte sowie eine allgemeine histologische Analyse von Organen und Geweben. Die Durchführung der Langzeitstudie ist im Methodenteil unter 3.2.4.2 beschrieben. Tabelle 16 (siehe Anhang, Kapitel 9.3) zeigt die Quantile der Spannbreite des Alters der untersuchten Tiere aus der Langzeitbeobachtung.

4.2.3.1 Übersicht über die Gewichtsentwicklung von Wildtyp- und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen

Innerhalb der fast 120-wöchigen Untersuchung konnte bei weiblichen sowie männlichen $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen ein tendenziell geringeres Körpergewicht festgestellt werden als bei den wildtypischen Kontrolltieren.

Generell wiesen weibliche Mäuse ein geringeres Körpergewicht auf als gleichaltrige männliche Tiere. Während männliche Tiere ihr jeweiliges Maximalgewicht im Alter von etwa 400 bis 500 Tagen erreichten, war dies bei weiblichen Tieren erst ab einem Alter von 500 bis 600 Tagen zu sehen. In Abbildung 28 ist die Veränderung des Körpergewichtes in Abhängigkeit vom Alter der Tiere dargestellt. Zu beachten ist, dass eine bestimmte Anzahl (n) von Tieren zusammengefasst wurde, die ein Altersband von bis zu sieben Tagen umfasst. Die Angabe des Alters in Tagen auf der Abzisse sowie das Gewicht der Tiere auf der Ordinate stellen daher jeweils Mittelwerte dar. Die Gewichtsentwicklung eines jeden einzelnen Tieres zeigen Abbildung 39 und Abbildung 40 im Anhang, Kapitel 9.3. Hierbei entsprechen die Nummern den in der Studie nummerierten Mäusen ($G\alpha_{i3}^{(-/-)}$ männlich, Nr. 1 – 20; $G\alpha_{i3}^{(-/-)}$ weiblich, Nr. 21 – 40; Wt männlich, Nr. 41 – 60 und Wt weiblich, Nr. 61 – 80).

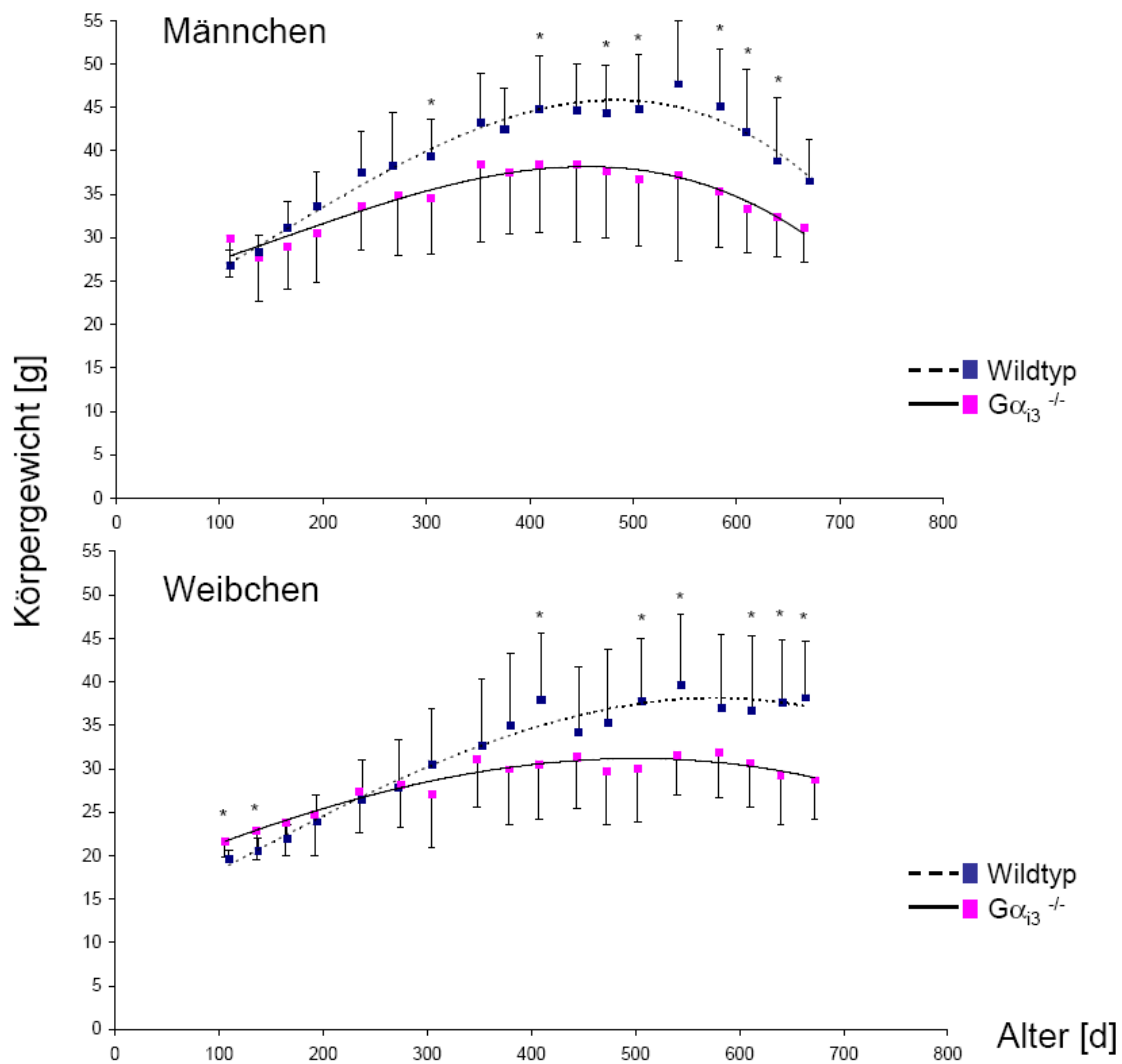


Abbildung 28. $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse besitzen ein geringeres Körpergewicht als Wildtyp-Mäuse

Darstellung des Körpergewichts von männlichen und weiblichen C57BL/6-Mäusen in Abhängigkeit vom Alter der Tiere. Die $G\alpha_{i3}$ -deletierten Mäuse wiegen geschlechtsspezifisch weniger als die jeweiligen Wildtyp-Mäuse. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte der Körpergewichte (\pm -STABW) von Wildtyp-Mäusen (■, $n = 8 - 19$; Alter in Tagen $\pm 3,5$) und $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen (■, $n = 6 - 13$; Alter in Tagen $\pm 3,5$), * $P < 0,05$, t-Test. Eine Korrelation der Daten wurde polynomisch mit drittem Grad vorgenommen (Mittelwert: $G\alpha_{i3}^{-/-}$ —; Wildtyp ----). Die Gewichtskurven der Einzeltiere zeigen Abbildung 39 und Abbildung 40 im Anhang, Kapitel 9.3.

4.2.3.2 Analyse des Fettgewebes bei $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen

Um die Ursache für das tendenziell verminderte Körpergewicht $G\alpha_{i3}$ -defizienter Mäuse zu analysieren, wurde zunächst das abdominale subkutane Fettgewebe der Mäuse betrachtet. Hierbei war auffällig, dass die $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuse neben einem geringeren Körpergewicht, eine geringere abdominale subkutane Fetteinlagerung aufwiesen. Keines der untersuchten $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuse wies eine

mit Wildtyp-Mäusen vergleichbare abdominale und subkutane Fetteinlagerung auf (siehe Abbildung 29). Im Vergleich zu den mutanten Mäusen wiesen fast die Hälfte aller verstorbenen Wildtyp-Mäuse vermehrt abdominale und subkutane Fetteinlagerungen auf.



Abbildung 29. $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse weisen ein geringeres Fettgewebe auf als Wildtyp-Mäuse

$G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse wiesen anders als die Kontrolltiere, kaum abdominale und subkutane Fetteinlagerungen auf. Fotografische Aufnahmen einer 27,8 Monate alten weiblichen $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Maus und einer 22,4 Monate alten weiblichen Wildtyp-Maus.

4.2.3.3 Fellveränderungen der $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse

Eine weitere Auffälligkeit zeigten $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse hinsichtlich ihres Fells (siehe Abbildung 30). Im Laufe des Beobachtungszeitraums zeigten $G\alpha_{i3}$ -defiziente Tiere früher als die gleichaltrigen Wildtyp-Tiere grau und struppig werdendes Fell. Bereits im

Alter von etwa zwölf Monaten zeigten 32,5 % der in der Studie befindlichen $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse ein graues, struppiges Fell, wohingegen dies bei keinem der 40 Wildtyp-Mäuse zu diesem Zeitpunkt beobachtet werden konnte. Mit etwa 22 Monaten wiesen bereits 70 % der $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse ein graues und struppiges Fell auf, wohingegen dies nur bei 27,5 % der verstorbenen Wildtyp-Mäuse beobachtet wurde (Tabelle 11). Insgesamt ergrauen die männlichen Tiere schneller als die weiblichen, siehe Tabelle 11.

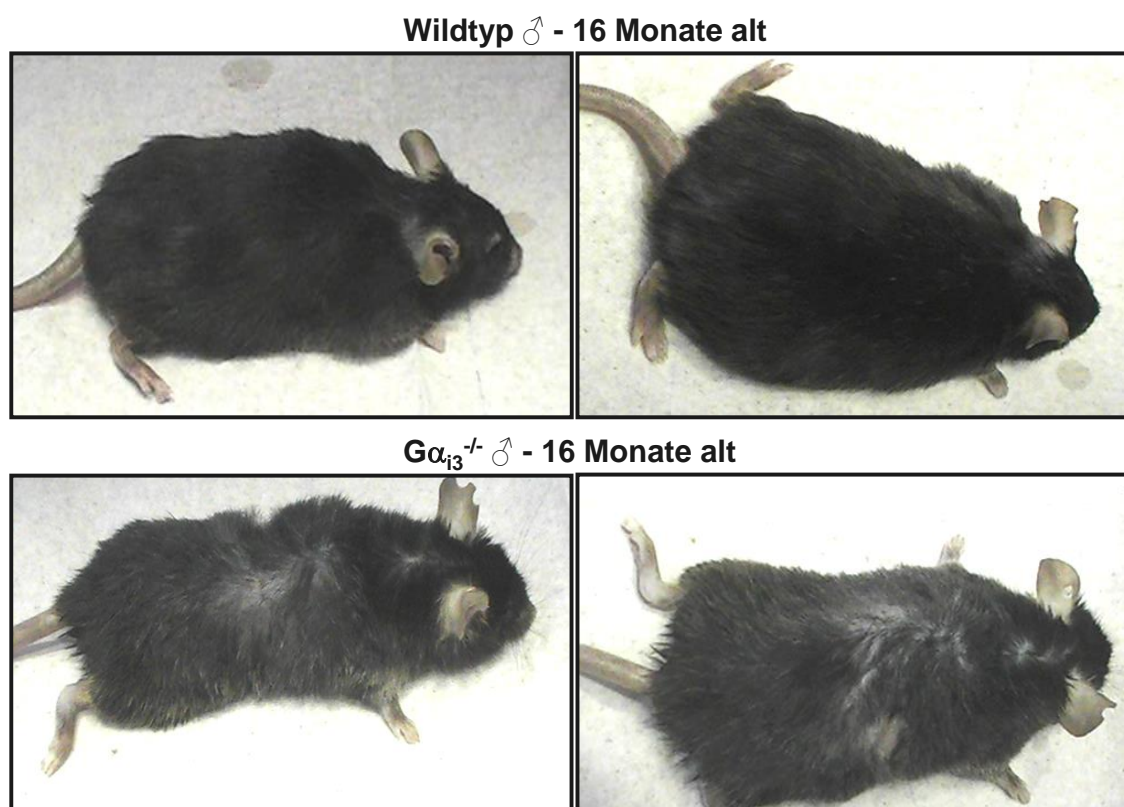


Abbildung 30. Das Fell von $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen ergraut vorzeitig

Die Abbildung zeigt den Unterschied des Fellaussehens zwischen männlichen C57BL/6 Wildtyp- und männlichen C57BL/6 $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Tieren gleichen Alters.

Tabelle 11: Auftreten von grauem, struppigem Fell bei $G\alpha_{i3}^{-/-}$ - und Wildtyp-Mäusen

Struppiges, graues Feller- scheinen	$G\alpha_{i3}^{-/-}$			Wildtyp		
	♂	♀	gesamt	♂	♀	gesamt
12 Monate	50 % (10)	15 % (3)	32,5 %	0 % (0)	0 % (0)	0 %
15 Monate	55 % (11)	15 % (3)	35 %	20 % (4)	0 % (0)	10 %

Struppiges, graues Feller- scheinen	$G\alpha_{i3}^{(-/-)}$			Wildtyp		
	♂	♀	gesamt	♂	♀	gesamt
22 Monate	85 % (17)	55 % (11)	70 %	30 % (6)	25 % (5)	27,5 %

Dargestellt in Prozent ist das Auftreten von Fellveränderungen von männlichen und weiblichen Tieren zu bestimmten Alterszeitpunkten. Die Anzahl der Tiere mit Fellveränderung ist in Klammern gesetzt.

4.2.3.4 Kaplan-Meier Überlebensanalyse

Innerhalb von etwa 28 Monaten verstarben alle 80 Tiere der Langzeitstudie. Im Sinne des Tierschutzes und um unnötiges Leiden der Tiere zu vermeiden, wurden die Mäuse möglichst nahe ihrem natürlichen Ableben aus der Haltung ausgeschleust und getötet. Dieser Zeitpunkt wurde definiert als der Moment, in dem die Tiere ein krankes Erscheinen (z. B. Apathie, massiv eingeschränkte körperliche Fitness) oder offensichtliche Beschwerden oder Leiden zeigten (z. B. starke Bewegungsstörungen, Auftreten äußerlich sichtbarer Schwellungen). Zudem konnte diesen Tieren Blut und Organe entnommen werden, ohne dass es zu einer autolytischen Zersetzung von Blut und Organen kam. Nicht bei allen Mäusen war dies möglich, da die Tiere zum Teil über Nacht verstarben, und eine Blut- und Organentnahme nach Auffinden der Tiere nicht mehr möglich war. Insgesamt verstarben acht $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse (vier männliche sowie vier weibliche Tiere) sowie neun Wildtyp-Mäuse (fünf männliche sowie vier weibliche Tiere) unkontrolliert. Zur Berechnung der Kaplan-Meier Überlebenskurve wurde nicht zwischen den 17 tot aufgefundenen und den 63 ausgeschleusten Tieren unterschieden. Abbildung 31 zeigt die Kaplan-Meier Überlebenskurve aller 40 $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse und 40 Wildtyp-Mäuse. Die mittlere Lebensdauer aller untersuchten $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse liegt bei 775 ± 32 Tagen (Median = 832 Tage) und aller untersuchten Wildtyp-Mäuse bei 750 ± 24 Tage (Median = 767 Tage).

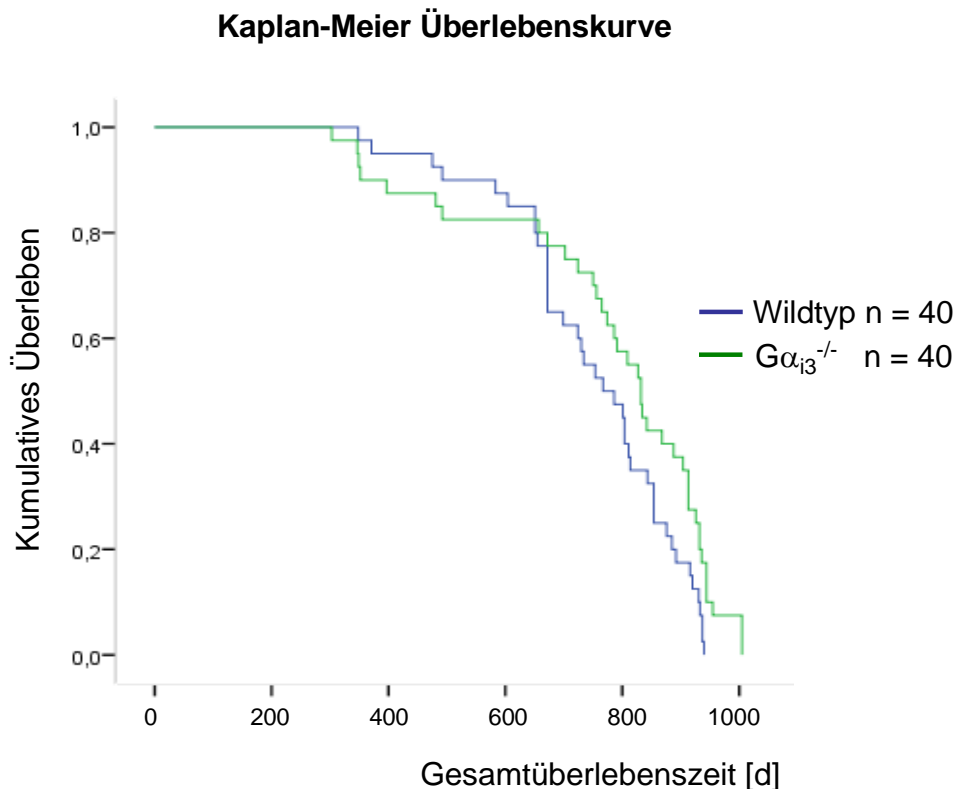


Abbildung 31. Wildtyp- und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Tiere unterscheiden sich in ihrer Lebensdauer

Die Grafik zeigt die Kaplan-Meier Überlebenskurven der Wildtyp- und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Tiere, Mittelwerte \pm SD. Die mittlere Überlebenszeit von Wildtyp-Tieren beträgt 750 ± 24 Tage (Median = 767 Tage) und unterscheidet sich signifikant von $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Tieren mit 775 ± 32 Tagen (Median = 832 Tage; Logrank: $p = 0,03$).

Bei der Aufschlüsselung nach Geschlecht zeigen die Lebenskurven einen signifikanten Unterschied (Logrank $p = 0,03$) zwischen der Lebensdauer von $G\alpha_{i3}^{-/-}$ - und Wildtyp-Mäusen. Weibliche $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse lebten signifikant länger als $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -defiziente männliche Mäuse (821 ± 45 Tage versus 728 ± 45 Tage; $p = 0,047$). Auch im Vergleich zu weiblichen Wildtyp-Mäusen lebten die weiblichen $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse signifikant länger (821 ± 45 Tage versus 725 ± 37 Tage; $p = 0,015$).

Die unterschiedlichen geschlechts- und genotypenspezifischen Lebenszeiten sind in Abbildung 32 gezeigt. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Tabelle 12 wiedergegeben.

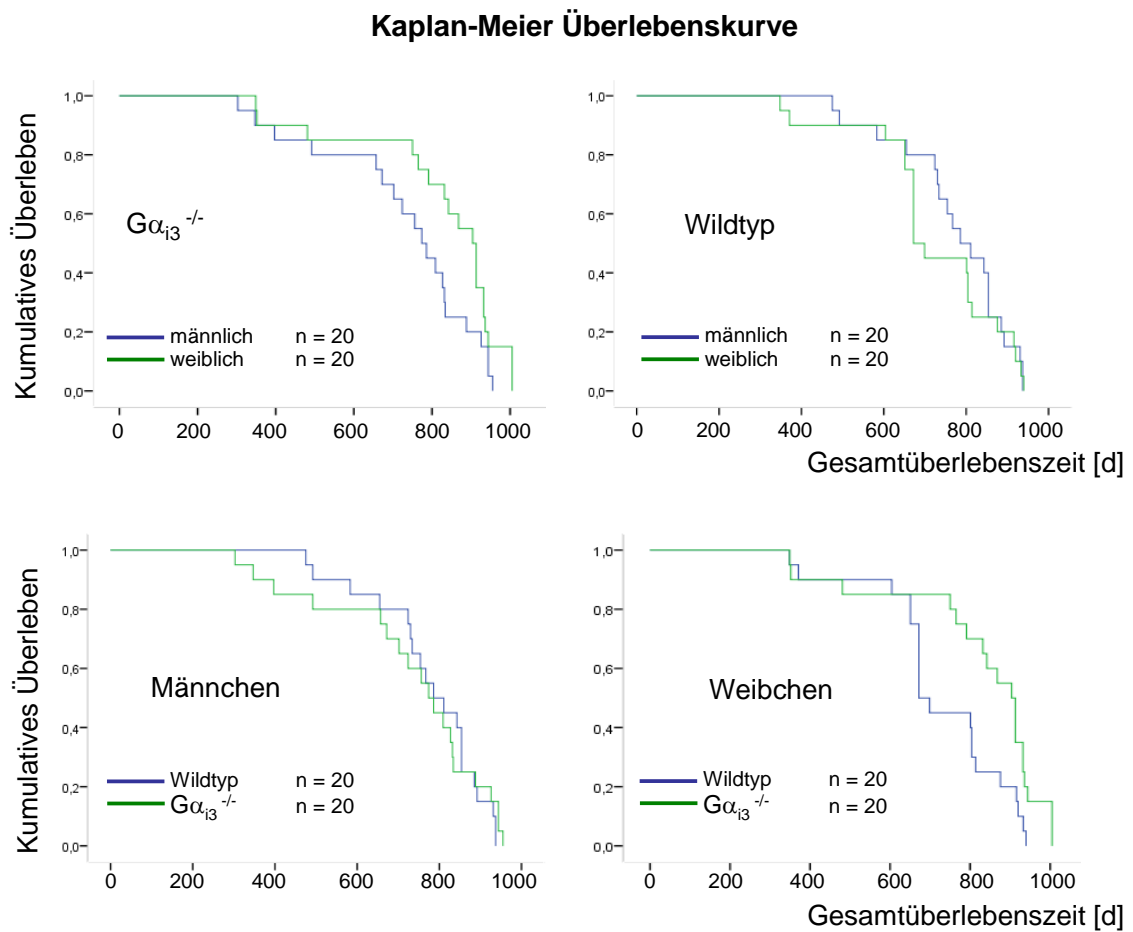


Abbildung 32. Die Lebensdauer von Wildtyp und G $\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen ist geschlechtsspezifisch

Oben: Die Grafik zeigt die geschlechtsspezifische Unterscheidung der Kaplan-Meier Überlebenskurven der Wildtyp- und G $\alpha_{i3}^{-/-}$ -Tiere, Mittelwerte \pm SD. Linke Seite: Die mittlere Lebensdauer der männlichen G $\alpha_{i3}^{-/-}$ -Tiere (blaue Linie) unterscheidet sich mit 728 ± 45 Tagen (Median = 774 Tage) schwach signifikant von der Lebensdauer der weiblichen G $\alpha_{i3}^{-/-}$ -Tiere (grüne Linie; 821 ± 45 Tage; Median = 904 Tage; Logrank: $p = 0,047$). Rechte Seite: Die mittlere Lebensdauer der männlichen Wildtyp-Tiere (blaue Linie) unterscheidet sich mit 775 ± 31 Tagen (Median = 786 Tage) nicht signifikant von der Lebensdauer der weiblichen Tiere (grüne Linie; 725 ± 37 Tage; Median = 672 Tage; Logrank: $p = 0,588$). **Unten:** Die Grafik zeigt die genotypspezifische Unterscheidung der Kaplan-Meier Überlebenskurven der männlichen und weiblichen Tiere, Mittelwerte \pm SD. Linke Seite: Die mittlere Lebensdauer der männlichen Wildtyp-Mäuse (blaue Linie) unterscheidet sich mit 775 ± 31 Tagen (Median = 786 Tage) nicht signifikant von der Lebensdauer der männlichen G $\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse (grüne Linie; 728 ± 45 Tage; Median = 774 Tage; Logrank: $p = 0,854$). Rechte Seite: Die mittlere Lebensdauer der weiblichen Wildtyp-Tiere (blaue Linie) unterscheidet sich mit 725 ± 37 Tagen (Median = 672 Tage) signifikant von der Lebensdauer der weiblichen G $\alpha_{i3}^{-/-}$ -Tiere (grüne Linie; 821 ± 45 Tage; Median = 904 Tage; Logrank: $p = 0,015$).

Tabelle 12: Übersicht der Lebensdauer von Wildtyp- und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen

Geschlecht	Genotyp	Überlebenszeit (Tage)						n
		Median	Mittelwert	p	Min-Max	Älteste Q _{0.9}	Jüngste Q _{0.1}	
beide	Wildtyp	767	750 ± 24	0,030	348 - 940	931	574	40
	$G\alpha_{i3}^{-/-}$	832	775 ± 32		303 - 1005	945	393	40
Weibchen	Wildtyp	672	725 ± 37	0,015	348 - 940	921	581	20
	$G\alpha_{i3}^{-/-}$	904	821 ± 45		349 - 1005	1005	468	20
Männchen	Wildtyp	786	775 ± 31	0,854	475 - 937	932	574	20
	$G\alpha_{i3}^{-/-}$	774	728 ± 45		303 - 955	944	392	20

n = Anzahl der Mäuse

p = logrank nach student's t-test

4.2.3.5 Auswertung von klinisch-chemischen Parametern der Serumanalyse

Durch die genaue Beschreibung des Mäusegenoms und die Fähigkeit, durch gezielte Genveränderung Mäuse mit Genüberexpression, -mutation und -deletion zu züchten, können die unmittelbaren Konsequenzen genetischer Veränderungen auf die Funktionsfähigkeit des Organismus untersucht werden. Bei Genmanipulationen ist es jedoch häufig nicht möglich Vorhersagen über eventuell auftretende Defekte zu machen. Da sich die Auswirkungen von Genmanipulationen oftmals in laborchemischen Parametern bemerkbar machen, wurden im Rahmen der Langzeitstudie die Seren von $G\alpha_{i3}$ -defizienten sowie von wildtypischen Mäusen auf 17 klinisch-chemische Parameter untersucht (siehe Methoden, Kapitel 3.2.4.2 und Tabelle 9). Die über zwei Jahre andauernde Langzeitstudie sollte primär einen ersten Hinweis auf mögliche Unterschiede wie z. B. der Lebensdauer und des Körpergewichtes zwischen den mutanten $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen und den wildtypischen Kontrolltieren geben. Die Untersuchung des Serums wurde mitaufgenommen, um zusätzliche Informationen über die Mäuse zu erlangen. Um eine definierte Keimflora beizubehalten, wurden die Mäuse während des gesamten Studienzeitraums im Überdrucksisolator belassen ohne dass zwischenzeitliche Ein- und Ausschleusungen der Tiere vorgenommen wurden. Die Untersuchung der klinisch-chemischen Parameter aus den Seren der Tiere wurde daher nicht zu definierten Zeitpunkten innerhalb der Studie sondern bei Tieren, die möglichst

nahe ihrem natürlichen Ablebens ausgeschleust wurden, entnommen (siehe hierzu auch Ergebnisse, Kapitel 4.2.3.4.). Bei bereits verstorbenen Tieren wurde kein Serum entnommen. Im Anhang, Kapitel 9.5 (Tabelle 17 bis Tabelle 20) sind die Ergebnisse der klinisch-chemischen Serumanalyse eines jedes Tieres aus den beiden genotypischen Tiergruppen dargestellt. Hierbei entsprechen die Tiernummern den in der Studie nummerierten Mäusen und können den einzelnen Gewichtsverläufen zugeordnet werden (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.2.3.1 sowie Abbildung 39 und Abbildung 40 im Anhang, Kapitel 9.3). Aus jeder Tiergruppe konnten Daten mit je 11 – 15 Mäusen generiert werden. Die Ergebnisse zeigen starke Schwankungen der einzelnen klinisch-chemischen Parameter innerhalb jeder Gruppe, so dass eine statistisch signifikante Aussage auf Unterschiede zwischen den Genotypen nicht getroffen werden kann.

5 DISKUSSION

Die autophagische Proteolyse ist ein hormonell und metabolisch regulierter, lysosomaler Proteindegradationsweg, über den intrazelluläre Proteine unter Bildung von Autophagosomen bis zu einzelnen Aminosäuren abgebaut werden können.

Erste Hinweise von Prof. Häussinger und Mitarbeitern aus Untersuchungen über den Effekt von PTX an Rattenlebern ließen vermuten, dass G_i -Proteine auch eine Rolle bei der autophagischen Proteolyse spielen könnten. Anfang der 90er Jahre wird eine Rolle der GTP-bindenden Proteine in autophagischen Prozessen angenommen, da gezeigt werden konnte, dass GTP γ S, ein nicht hydrolisierbares GTP-Analogon, die autophagische Sequestrierung hemmt (Kadowaki *et al.*, 1994). Frühere Untersuchungen an der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 haben heterotrimere G-Proteine der Pertussistoxin (PTX)-sensitiven $G\alpha_i$ -Familie mit der autophagischen Sequestrierung in Zusammenhang gebracht. Es wurde gezeigt, dass $G\alpha_{i3}$, nicht aber $G\alpha_{i2}$, eine spezifische Funktion bei der Makroautophagie hat.

5.1 Funktionelle Substitution der G_i -Proteine $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ füreinander

Um die Rolle von G_i -Proteinen bei hepatischen Funktionen zu untersuchen, wurde zunächst von Frau Katja Pexa aus unserem Labor, mittels Immunoblot-Analysen und ADP-Ribosylierungs-Assays die Expression der einzelnen G_i -Isoformen in Zellmembranpräparationen aus Lebergewebe analysiert. Die Untersuchungen zeigten, dass von den drei bekannten $G\alpha_i$ -Isoformen in der Leber hauptsächlich $G\alpha_{i2}$, geringere Mengen von $G\alpha_{i3}$, aber kein $G\alpha_{i1}$ exprimiert werden (siehe Anhang, Kapitel 9.1 Abbildung 38A).

Frühere Untersuchungen mit gereinigten Proteinen hatten gezeigt, dass $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in Rekonstitutionsexperimenten weitestgehend funktionell füreinander substituieren können (Degtiar *et al.*, 1997). Außerdem ist bekannt, dass die konstitutive genetische Ablation einer $G\alpha_i$ -Isoform in Mäusen die Hochregulation einer anderen $G\alpha_i$ -Isoform induziert (Gohla *et al.*, 2007a, Rudolph *et al.*, 1996, Wiege *et al.*, 2012). Dies hat zur Hypothese geführt, dass der Verlust einzelner $G\alpha_i$ -Isoformen *in vivo* funktionell durch andere $G\alpha_i$ -Isoformen kompensiert werden kann. In Übereinstimmung damit hat die konstitutive Gendeletion von $G\alpha_{i2}$ oder $G\alpha_{i3}$ in Mäusen relativ moderate Effekte

(Jain *et al.*, 2001). Um genspezifische von redundanten biologischen Funktionen *in vivo* unterscheiden zu können, wurden homo- oder heterozygote $G\alpha_{i2}$ - und/oder $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse gekreuzt und die Mendel-Verteilung der neun möglichen Genotypen analysiert (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.2.1). Der vollständige Verlust der peripheren G_i -Proteine in $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ -doppeldefizienten Mäusen führte schon *in utero* zu einer frühembryonalen Letalität derzeit noch unbekannter Ursache (siehe Tabelle 10). Während die Gegenwart eines einzigen Allels von $G\alpha_{i3}$ für die Embryonalentwicklung ausreicht, ist mindestens ein Allel $G\alpha_{i2}$ für die *extrauterine* Entwicklung notwendig (Abbildung 26). Zusammen deutet dies auf die Existenz einer wichtigen, funktionellen und genspezifischen Rolle der beiden G_i -Proteine $G\alpha_{i3}$ und $G\alpha_{i2}$ während der embryonalen bzw. neonatalen Entwicklung hin.

5.2 Die Beteiligung von $G\alpha_{i3}$ bei der Insulin- und Aminosäure-vermittelten hepatischen autophagischen Proteolyse

Um die genaue Funktion der G_i -Isoformen für die Regulation der autophagischen Proteolyse in der Leber zu untersuchen, wurde in Kollaboration mit Prof. Dieter Häussinger/Prof. Stephan vom Dahl, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf die autophagische Aktivität mittels *In-situ*-Leberperfusionen in Mäuselebern gemessen (siehe Anhang, Kapitel 9.1). Durch eine kurzfristige Perfusion der Mausleber mit PTX wurden peripher exprimierten G_i -Familienmitglieder akut funktionell inaktiviert (siehe Anhang, Kapitel 9.1, Abbildung 37). Dies ist mit einem genetischen Ansatz aufgrund der frühembryonalen Letalität der konstitutiv $G\alpha_{i2}/G\alpha_{i3}$ -doppeldefizienten Mäuse nicht möglich (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.2.1). Darüberhinaus können durch die akute Inaktivierung der G_i -Proteine mit PTX potenzielle Kompensationseffekte durch Hochregulation der jeweils anderen Isoform weitgehend ausgeschlossen werden (siehe Abschnitt 5.1). In diesem Ansatz konnte gezeigt werden, dass PTX die anti-proteolytische Wirkung physiologisch wichtiger Inhibitoren der Autophagie, darunter Insulin und Aminosäuren, in Mäuselebern praktisch vollkommen blockierte (siehe Anhang, Kapitel 9.1, Abbildung 37). Diese Ereignisse waren ein erster substantieller Hinweis darauf, dass G_i -Proteine an der Signaltransduktion des Insulin-Rezeptors beteiligt sind, und dass G_i -Proteine offenbar eine essentielle Rolle in durch Aminosäuren initiierten Signalwegen spielen.

Um die potentielle Rolle der beiden in Lebergewebe und Hepatozyten exprimierten PTX-Substrate, die G_i -Isoformen $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$, in der autophagischen Proteolyse direkt zu prüfen, wurden Leberperfusionsversuche mit $G\alpha_{i2}$ - bzw. $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen durchgeführt. Die Daten zeigten, dass die autophagische Proteolyse in $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuselebern durch Insulin- oder Phenylalanin kaum noch inhibiert werden konnte (siehe Anhang, Kapitel 9.1, Abbildung 38C). Im Gegensatz dazu war die antagonistische Wirkung von Insulin auf die autophagische Proteolyse in Abwesenheit von $G\alpha_{i2}$ intakt und vergleichbar mit Wildtyp-Mäusen. Diese Ergebnisse zeigen erstmals, dass die anti-autophagischen Effekte von Insulin und Aminosäuren obligat über $G\alpha_{i3}$ und nicht über das in der Leber quantitativ vorherrschende $G\alpha_{i2}$ verlaufen (Gohla *et al.*, 2007b, Kreuzer *et al.*, 2004). Welche molekularen Mechanismen liegen dieser Feststellung zugrunde?

Um die Rolle von $G\alpha_{i3}$ in autophagischen Prozessen auf zellulärer Ebene mit biochemischen und zellbiologischen Methoden untersuchen zu können, wurde zunächst ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper gegen die 14 C-terminalen Aminosäuren von $G\alpha_{i3}$ hergestellt und affinitätsgereinigt (siehe Methoden, Kapitel 3.2.3.3). Der generierte $G\alpha_{i3}$ -Antikörper erkennt in Hepatozyten und allen anderen bisher getesteten Zelltypen und Geweben im Immunoblot und in der Immunozytochemie spezifisch $G\alpha_{i3}$, nicht aber das eng verwandte $G\alpha_{i2}$ (Abbildung 13 und Abbildung 14). Um die Funktion von $G\alpha_{i3}$ in der Regulierung der Autophagie besser verstehen zu können, war es zunächst von Interesse, die subzelluläre Lokalisation von $G\alpha_{i3}$ im Vergleich zu $G\alpha_{i2}$ in primären Maus-Hepatozyten zu analysieren.

5.2.1 $G\alpha_{i3}$ kolokalisiert mit LC3 auf Autophagosomen und Endomembranen

Durch die Kombination von Immunzytochemie mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie gelang es, in isolierten Hepatozyten zu zeigen, dass $G\alpha_{i3}$ unter normalen Zellkulturbedingungen primär diffus im Zytosol verteilt ist (Abbildung 18), während die Induktion der Autophagie durch Hungerung der Zellen eine Relokalisation von $G\alpha_{i3}$ an die Plasmamembran und an LC3-positive Autophagosomen und Lysosomen bewirkte (Abbildung 18). Darüberhinaus führte die Behandlung der gehungerten Hepatozyten mit physiologischen Inhibitoren der Autophagie wie mit Insulin oder Phenylalanin zur Auflösung des vesikulären Verteilungsmusters von LC3; einem Indiz für die effiziente Suppression der zellulären Autophagie (Abbildung 18). Zeitgleich mit dem Verlust der

LC3-positiven Autophagosomen verschwand interessanterweise auch die vesikuläre Lokalisation von $G\alpha_{i3}$. Stattdessen induzierte Insulin eine Akkumulation von $G\alpha_{i3}$ an der Plasmamembran. Die Behandlung der Zellen mit Phenylalanin führte zu einer diffusen, zytosolischen Verteilung von $G\alpha_{i3}$, ähnlich wie bei ruhenden Zellen (Abbildung 18).

Zudem war in $G\alpha_{i3}$ -defizienten Hepatozyten die vesikuläre Akkumulation von LC3 nach Induktion der zellulären Autophagie immunzytochemisch praktisch nicht mehr detektierbar (Abbildung 20A). Weiterhin scheint die Prozessierung von LC3-I in Membran-gebundenes LC3-II abhängig von $G\alpha_{i3}$ zu sein wie dies in Gesamtzell-Lysaten aus Hepatozyten gezeigt wurde (Abbildung 20B).

Die Befunde dieser Arbeit zeigen, dass $G\alpha_{i3}$ eine obligate Funktion bei der Weiterleitung anti-autophagischer Stimuli signalabwärts von Insulin- und Aminosäure-induzierten Signalwegen hat. Die Daten legen nahe, dass ein Teil der anti-katabolen Effekte von Insulin auf die Umverteilung von $G\alpha_{i3}$ von Autophagosomen an intrazelluläre, zytosolische Kompartimente beruhen. Allerdings waren die molekularen Mechanismen der Kommunikation zwischen der Insulin-Rezeptor-Tyrosinkinase und den an heptahelikale Rezeptoren gekoppelten G_i -Proteinen weitgehend ungeklärt. Insofern war es bisher unklar, wie $G\alpha_{i3}$ in die Insulin- und Aminosäure-abhängige Regulation der Autophagie involviert ist.

Wie passen die Ergebnisse zusammen, dass in $G\alpha_{i3}$ -defizienten Hepatozyten eine Akkumulation von LC3-positiven Vesikeln nicht mehr zu erkennen war und zudem die Prozessierung von LC3-I in LC3-II beeinträchtigt zu sein scheint mit den Ergebnissen aus unseren *In-situ*-Leberperfusionsexperimenten die gezeigt haben, dass bei Inaktivierung von $G\alpha_{i3}$ durch PTX bzw. bei $G\alpha_{i3}$ -defizienten Lebern die Autophagie nicht inhibiert werden konnte (siehe Anhang, Kapitel 9.1). Wie bereits in vorherigen Kapiteln dieser Dissertation erläutert, ist der Status in dem $G\alpha_{i3}$ entweder mit GDP oder mit GTP vorliegen kann, ausschlaggebend für die Regulation der Autophagie. So induziert inaktives GDP-gebundenes $G\alpha_{i3}$ die autophagische Proteolyse, während $G\alpha_{i3}$ im aktiven Zustand gebunden an GTP die Autophagie inhibiert (Garcia-Marcos *et al.*, 2011, Ogier-Denis *et al.*, 1995, Ogier-Denis *et al.*, 1996). Der Übergang vom inaktiven GDP- in den aktiven GTP-Zustand kann durch die Wirkung von Proteinen beschleunigt werden, die eine Abdissoziation des gebundenen GDP bewirken. Hierzu gehören Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF). Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Marilyn G. Farquhar zeigen, dass GIV (*G α -Interacting Vesicle-associated protein*, auch *Girdin* genannt), ein Protein mit GEF-Funktion, sowie AGS3, das eine GDI-

Funktion besitzt, die Autophagie indirekt über die Regulierung von $G\alpha_{i3}$ beeinflussen (Garcia-Marcos *et al.*, 2009, Garcia-Marcos *et al.*, 2011). Die Arbeitsgruppe um Prof. Marilyn G. Farquhar bestätigten die in dieser Dissertation vorgestellten Befunde, dass die zelluläre Lokalisation von $G\alpha_{i3}$ vom metabolischen Zustand der Zelle abhängt und nur unter Nährstoff-armen Bedingungen $G\alpha_{i3}$ mit LC3 an autophagosomale Membranen kolokalisiert und dadurch eine wichtige Rolle in der Bildung von autophagosomalen Membranen besitzt. Das könnte erklären, warum in unseren Experimenten bei $G\alpha_{i3}$ -Defizienz immunozytochemisch eine verringerte Anhäufung von LC3-positiven Vesikeln und im Western Blot eine beeinträchtigte Prozessierung von LC3-I in die Autophagosomenmembran-assoziierte LC3-II-Form zu sehen ist. Darüberhinaus zeigen sie, dass sowohl GIV als auch $G\alpha_{i3}$ für die anti-autophagischen Effekte von Insulin und Wachstumsfaktoren verantwortlich sind (Garcia-Marcos *et al.*, 2011). Hierbei ist für die inhibierende Wirkung von Insulin und Wachstumsfaktoren auf die autophagische Proteolyse der Status in dem sich $G\alpha_{i3}$ befindet wichtig - $G\alpha_{i3}$ muss GTP gebunden sein. Die Autoren zeigten mit Hilfe der immunozytochemischen Detektion von LC3, dass in HeLa-Zellen, die eine GEF-defiziente Mutante von GIV exprimieren und außerstande sind $G\alpha_{i3}$ zu aktivieren (sog. GIV-FA-Zellen), die Autophagie unter Nährstoff-reichen Bedingungen (10 % FCS) erhöht ist und es selbst nach der Zugabe von Insulin in das „Hungerungsmedium“ (100 nM Insulin; 0,2 % FCS) zu keiner anti-autophagischen Wirkung des Insulins kommt. Wildtypische HeLa-Zellen (GIV-WT) und GIV-FA-Zellen unterscheiden sich durch eine einzige Punktmutation, bei dem die GEF-Funktion von GIV selektiv und spezifisch inaktiviert ist (Garcia-Marcos *et al.*, 2009). Daraus folgern sie, dass für die Insulin- und Wachstumsfaktoren-vermittelte Inhibierung der Autophagie die GEF-Funktion von GIV, also die Fähigkeit von GIV $G\alpha_{i3}$ zu binden und zu aktivieren, essentiell ist. Diese Ansicht der Autoren stimmt mit den Ergebnissen überein, die unsere Arbeitsgruppe in Kollaboration mit Prof. Dieter Häussinger in den *In-situ*-Leberperfusionsexperimenten generierten die zeigen, dass PTX, welches eine Aktivierung von $G\alpha_{i3}$ verhindert und somit $G\alpha_{i3}$ im GDP-gebundenen Zustand vorliegt, sowie die Deletion von $G\alpha_{i3}$ die anti-autophagische Wirkung von Insulin und Phenylalanin in Mäuselebern vollkommen blockierte (siehe Anhang, Kapitel 9.1). $G\alpha_{i3}$ muss also im aktiven GTP-gebundenen Zustand vorliegen, damit physiologische Inhibitoren der Autophagie wirken können. Jedoch ist unter „Hungerungsbedingungen“ $G\alpha_{i3}$ wichtig für die Induktion der Autophagie bzw. die ersten Schritte in der Biogenese der Autophagosomen. Hier spielt das AGS3 eine wichtige Rolle, das es $G\alpha_{i3}$ in der inaktiven GDP-Konformation hält (Pattingre *et al.*, 2003). Die Untersuchungen von

Prof. Marilyn G. Farquhar und Mitarbeitern zeigen, dass GIV und AGS3 konzentrationsabhängig und reversibel die Aktivität von $G\alpha_{i3}$ beeinflussen können und, abhängig vom metabolischen Status der Zelle, um die gleiche Bindungsstelle von $G\alpha_{i3}$ konkurrieren (Garcia-Marcos *et al.*, 2011). So zeigten sie, dass das GEF-Motiv von GIV und die GoLoco-Bindungsregion von AGS3, welches für die GDI-Wirkung von AGS3 verantwortlich ist, zwischen der Switch-II- und der $\alpha 3$ -Helix-Region von $G\alpha_{i3}$ überlappende Bindungsstellen aufweisen. Interessanterweise unterscheiden sich in dieser Region $G\alpha_{i1/i3}$ und $G\alpha_{i2}$ in nur einer Aminosäure voneinander (Alanin \rightarrow Aspartat; siehe Abbildung 33), was wahrscheinlich für die schwächere Bindung von AGS3 zu $G\alpha_{i2}$ verantwortlich zu sein scheint.

Vornehmlich unter „Hungerungsbedingungen“ (0,2 % FCS) bindet die GoLoco-Region von AGS3 an $G\alpha_{i3}$ -GDP, was nach Zugabe von Insulin um bis zu 80 % reduziert war. Denn unter diesen Nährstoff-reichen Bedingungen entsteht hauptsächlich der GIV- $G\alpha_{i3}$ -Komplex. In wildtypischen HeLa-Zellen erhöht Insulin die Bildung von GIV- $G\alpha_{i3}$ -Komplexen und löst gleichzeitig die AGS3- $G\alpha_{i3}$ -Komplexe auf. Dies ist nicht der Fall in HeLa-Zellen, in denen die GEF-Funktion beeinträchtigt ist. Diese Ergebnisse zeigen also eindrucksvoll, dass die GEF-Funktion von GIV, also die Aktivierung von $G\alpha_{i3}$, obligat ist für die Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen AGS3- $G\alpha_{i3}$ - und GIV- $G\alpha_{i3}$ -Komplexen in die Richtung der Bildung von GIV- $G\alpha_{i3}$ -Komplexen und somit die anti-autophagische Wirkung des Insulins durch die Aktivierung von $G\alpha_{i3}$ hervorgerufen wird. Eine schematische Darstellung dieser Hypothese ist in Abbildung 34 dargestellt.

Unter Bezugnahme auf die Befunde dieser Dissertation, die in Gohla *et al.*, 2007b publiziert wurden, untersuchte die Arbeitsgruppe um Prof. Farquhar ob AGS3, welches $G\alpha_{i3}$ über das GoLoco-Motiv bindet und im inaktiven GDP-Status hält, auch an LC3-positive Autophagosomenmembranen lokalisiert. Mit Pulldown- und Immunopräzipitationsexperimenten fanden sie heraus, dass AGS3 eine durchgehende, vom metabolischen Status der Zelle unabhängige, direkte Bindung mit membrangebundenem LC3 eingeht (Garcia-Marcos *et al.*, 2011). Weiterhin zeigten die Autoren, dass nur unter „Hungerungsbedingungen“ ein Komplex aus $G\alpha_{i3}$, AGS3 und LC3 *in vivo* gebildet wird und nur in Anwesenheit von AGS3 $G\alpha_{i3}$ über die Interaktion mit den GoLoco-Motiven von AGS3, an LC3-positive Membranen rekrutiert wird. AGS3 bildet also eine direkte Bindung mit membrangebundenem LC3 und stellt somit durch eine Art „molekulare Brücke“ die Verbindung zwischen $G\alpha_{i3}$ und LC3 her (Schema siehe Abbildung 34). Die konkurrierende und vom metabolischen Status der

Zelle abhängige Bindung von GIV bzw. AGS3 zu $G\alpha_{i3}$ und der damit verbundenen Aktivierung bzw. Deaktivierung des $G\alpha_{i3}$ -Proteins erklärt den dynamischen Wechsel der intrazellulären (GIV- $G\alpha_{i3}$ -Komplex) und vesikulären (AGS3- $G\alpha_{i3}$ -Komplex) Verteilung von $G\alpha_{i3}$. Dies ist wahrscheinlich auch der Grund, weshalb unter Nährstoffreichen Bedingungen sowie nach der Behandlung der gehungerten Zellen mit Insulin und Phenylalanin keine Kollokalisierung von $G\alpha_{i3}$ mit LC3-positiven Autophagosomen zu analysieren ist (siehe Abbildung 18, Ergebnisse, Kapitel 4.1.4). GIV und AGS3 üben entgegengesetzte Effekte auf die Bindung zwischen $G\alpha_{i3}$ und LC3 und somit zwischen $G\alpha_{i3}$ und den Autophagosomen aus. Vermutlich geschieht die Aktivierung von $G\alpha_{i3}$ durch GIV während der Insulin-vermittelten Aufhebung der Autophagie an zwei verschiedenen Stellen: Einerseits an den autophagosomalen Membranen, wo $G\alpha_{i3}$ aus dem AGS3-LC3-Komplex "herausgelöst" wird und andererseits an der Plasmamembran wo es in der Signalweiterleitung der durch Wachstumsfaktoren-vermittelten Aktivierung der Klasse I PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalkaskade involviert ist, wie dies im Fall des EGF-Rezeptors gezeigt wurde (Ghosh *et al.*, 2010). Unklar bleibt, ob diese beiden Vorgänge nacheinander oder simultan verlaufen und welche Rolle sie bei der Aufhebung des autophagischen Zellstatus besitzen.

Darüberhinaus konnte $G\alpha_{i3}$ nach Induktion der Autophagie nicht nur an Autophagosomen und Autolysosomen bzw. lysosomalen Kompartimenten, sondern zudem am endoplasmatischen Retikulum und an Endosomen detektiert werden (Abbildung 19). Die Kollokalisierung von $G\alpha_{i3}$ mit Markerproteinen für Membranen autophagischer Vesikel wurde durch die subzelluläre Fraktionierung von isolierten und unter „Hungerungsbedingungen“-kultivierten Hepatozyten mit anschließender Immunoblot-Analyse der aufgereinigten Organellen-Fractionen bestätigt (Abbildung 22). Diese Befunde sind interessant, da vermutlich diese Kompartimente an der autophagischen Proteolyse im Zusammenhang mit der Biogenese der Autophagosomen beteiligt sind und für deren Reifung zu lytischen Organellen verantwortlich sind (Meijer & Codogno, 2004). Fungiert das $G\alpha_{i3}$ -Protein auf Endomembranen als Signaltransduktor in autophagischen Prozessen? Spielt die $G\alpha_{i3}$ -GIV- bzw. die AGS3- $G\alpha_{i3}$ -Komplexbildung in diesem Zusammenhang eine Rolle? Die vorrangige Aufgabe der heterotrimeren G-Proteine ist die Weiterleitung extrazellulärer Signale in die Zelle. Dies geschieht durch die Kopplung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren an eine Vielzahl von transmembranären (z. B. Ionenkanäle und Adenylylzyklasen), Membran-assoziierten (z. B. Phospholipasen C β) und zytosolischen (z. B. Phosphoinositid (PI)-3-Kinase γ) Effektorsystemen (Birnbaumer, 2007).

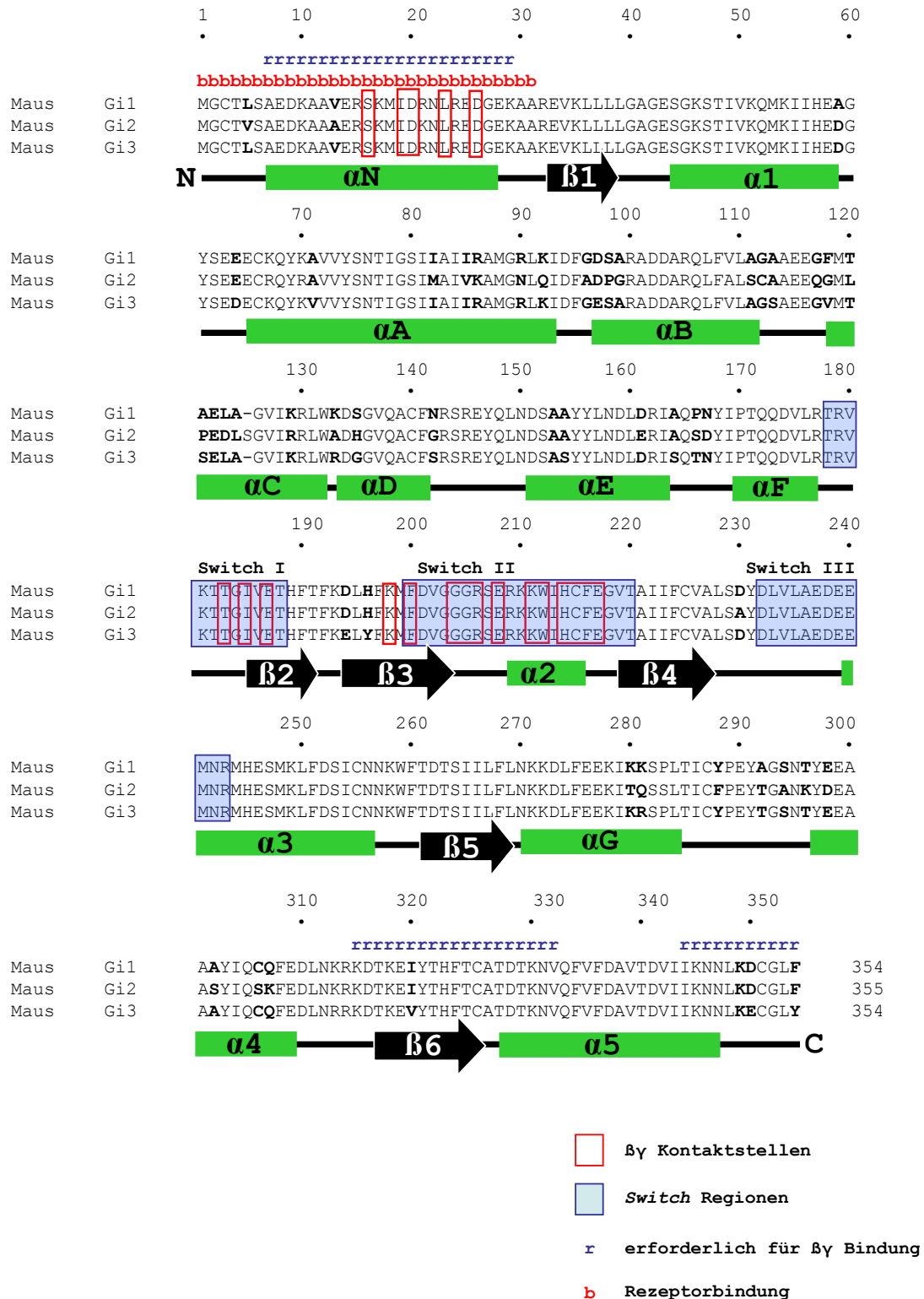


Abbildung 33. Aminosäuresequenzvergleich der murinen $G\alpha_i$ -Isoformen

Aminosäuren, die mit $G\beta\gamma$ bzw. mit Switch-Regionen eine Wechselwirkung eingehen, sind mit einer roten bzw. blauen Box markiert. Die unterschiedlichen Aminosäuren der einzelnen $G\alpha_i$ -Isoformen sind in fett dargestellt. Abbildung modifiziert nach (Lambright *et al.*, 1996).

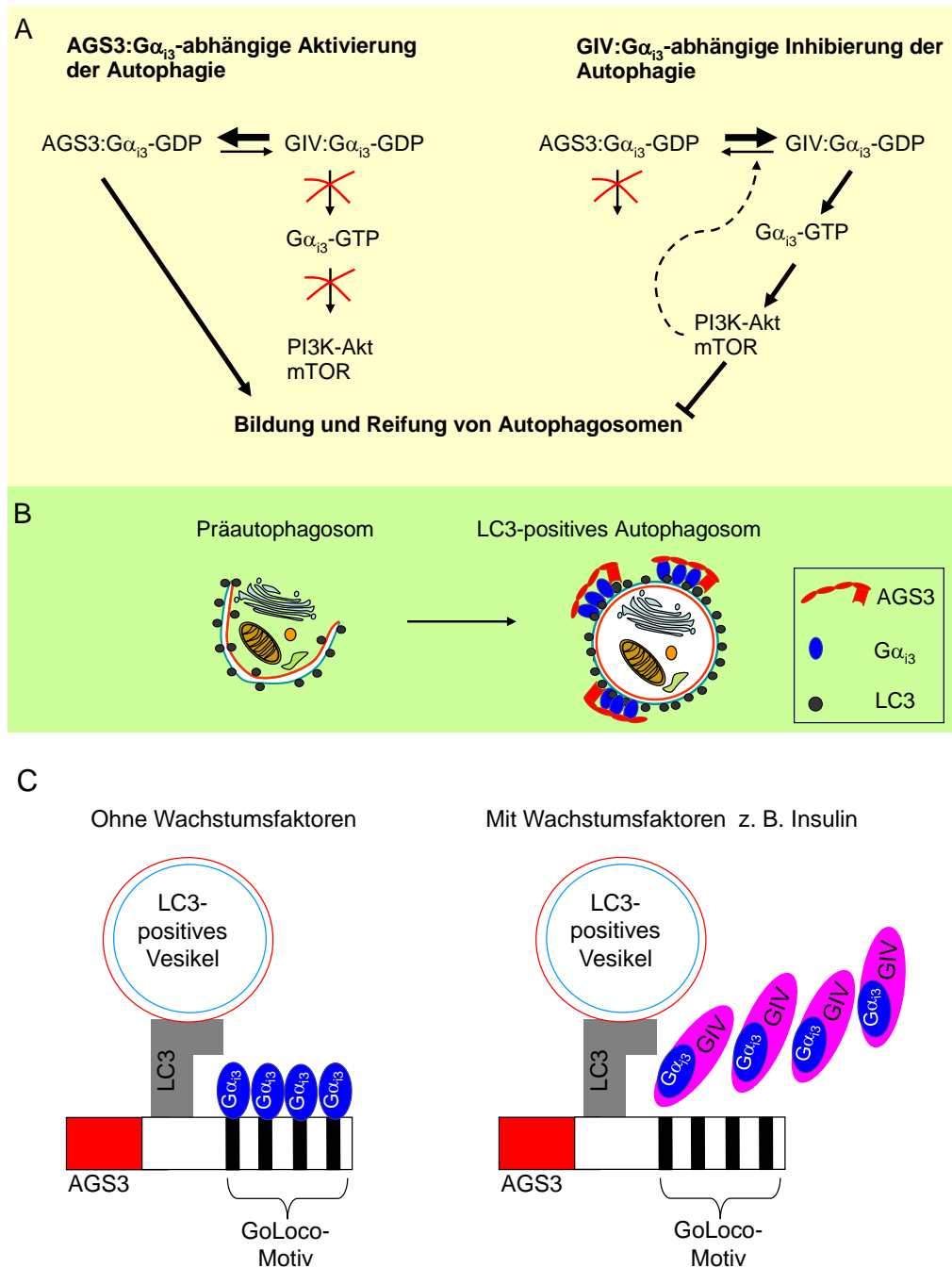


Abbildung 34 Schematische Darstellung des Zusammenspiels zwischen $G\alpha_{i3}$, GIV, AGS3 und LC3 bei An- und Abwesenheit von Wachstumsfaktoren

In Abwesenheit von Wachstumsfaktoren wie z. B. Insulin (A und C, jeweils linke Seite) interagiert $G\alpha_{i3}$ bevorzugt mit AGS3, seinem GDI, das es in einem inaktiven Zustand hält ($G\alpha_{i3}$ -GDP). Der $G\alpha_{i3}$ -AGS3-Komplex lokalisiert an die Membranen von LC3-positiven Vesikeln über die direkte Bindung von LC3 mit AGS3 und fördert damit die Autophagie d. h. die Reifung der Präautophagosomen in reife Autophagosomen (B). In Gegenwart von Wachstumsfaktoren (A und C, jeweils rechte Seite) wird $G\alpha_{i3}$ durch die GEF-Funktion von GIV aktiviert ($G\alpha_{i3}$ -GTP), das einerseits zur Förderung des anti-autophagischen Signalwegs von Klasse I PI3-Kinase-Akt-mTOR an der Plasmamembran führt und andererseits das aktive $G\alpha_{i3}$ aus dem LC3-AGS3- $G\alpha_{i3}$ -Komplex an der Autophagosomenmembran herauslöst. Hierdurch wird der Bildung von Autophagosomen und deren Reifung entgegengesteuert. Das Schema ist abgeleitet von (Garcia-Marcos *et al.*, 2011) und wurde modifiziert.

Es ist jedoch auch bekannt, dass $G\alpha_s$, $G\alpha_q$, $G\alpha_{i2}$, $G\alpha_{i3}$ und $G\alpha_z$ an Organellen-assoziierten Membranen lokalisieren und zusätzlich zur ihrer klassischen Funktion als Signaltransduktoren an der Plasmamembran eine Rolle in intrazellulären GPCR-induzierten Signaltransduktionswegen besitzen (Denker *et al.*, 1996, Maier *et al.*, 1995, Nürnberg & Ahnert-Hilger, 1996). So zeigen Koimmunopräzipitationsdaten der Arbeitsgruppe von Prof. Debora Farber, dass der GPCR *ocular albinism type 1* (OA1) auf Melanosomen lokalisiert ist und über $G\alpha_{i3}$, nicht aber $G\alpha_{i1}$ und $G\alpha_{i2}$, die Melanosomenbiogenese reguliert (Young *et al.*, 2008, Young *et al.*, 2011).

Interessant sind in diesem Zusammenhang die Studien aus dem Labor von Prof. Henrik Dohlman über die Pheromon-vermittelte Signalkaskade in *Saccharomyces cerevisiae*. In ihren Arbeiten zeigen sie eine direkte Verbindung zwischen dem G-Protein *G-protein alpha subunit 1* (GPA1) und dem *vacuolar protein sorting 34* Vps34-Vps15-Komplex auf (Slessareva *et al.*, 2006). Vps34, eine Klasse III PI3-Kinase, stellt die einzige PI3-Kinase in *Saccharomyces cerevisiae* dar, und setzt Phosphatidylinositol zu Phosphatidylinositol-3-phosphat um. Die Lipidkinaseaktivität von Vps34 wird durch die Proteinkinase *vacuolar protein sorting 15* (Vps15) aktiviert und der Vps34-Vps15-Komplex kann an Endosomen rekrutiert werden (Backer, 2008). Nach dem Modell von Slessareva verlaufen die initialen Signalschritte nach dem klassischen GPCR/G-Protein/Effektor-Modell, jedoch nicht an Plasmamembranen, sondern an Endomembranen. Die Autoren vermuten, dass $G\alpha$ -GTP in der Hefe an endosomale Membranen transloziert, wo es die endosomal lokalisierte Klasse III PI3-Kinase, Vps34, aktiviert, das wichtig für die Biogenese von Autophagosomenmembranen ist (Meijer & Codogno, 2004). In der Hefe besteht diese PI3-Kinase aus vier Untereinheiten, mit einer katalytischen Untereinheit Vps34, und einer regulatorischen Untereinheit Vps15. Nach der Aktivierung von GPA1 bindet $G\alpha$ -GTP und aktiviert Vps34 zur Bildung von PIP_3 , wodurch weitere Proteine an das Endosom rekrutiert werden können. $G\alpha$ -GDP bindet Vps15, das C-terminale WD40-Domänen aufweist und strukturelle Ähnlichkeit mit $G\beta$ aufzeigt, ohne jedoch die PI3-Kinaseaktivität zu stimulieren. Möglicherweise durchläuft $G\alpha$ am Endosom Zyklen von GTP-Bindung und Hydrolyse, wodurch $G\alpha$ alternierend an die katalytische bzw. an die regulatorische Untereinheit von PI3-Kinase binden würde. Die Identifizierung des Klasse III PI3-Kinasekomplexes als Effektor von intrazellulär lokalisierten G-Proteinen in Hefe könnte einen Hinweis auf die Rolle des $G\alpha_{i3}$ in intrazellulären Signalwegen in Hepatozyten liefern.

5.2.2 Funktion von $G\alpha_{i3}$ in mTOR-medierten Signalwegen

Eine mögliche Funktion von $G\alpha_{i3}$ ist die Beteiligung in der Regulierung der mTOR-Kinase. Es ist bekannt, dass die Insulin- und Aminosäure-abhängige Regulation der Autophagie über die Serin/Threonin-Kinase mTOR, z. B. distal zur Plasmamembran mediert werden kann (Meijer & Codogno, 2004).

mTOR ist eine hochkonservierte Proteinkinase, welche eine zentrale Schaltstelle des Zellwachstums darstellt. Nährstoffe wie Wachstumsfaktoren, Insulin oder Aminosäuren führen zu einer Phosphorylierung von mTOR an Serin²⁴⁴⁸ und somit zu einer Aktivierung der mTOR-Kinase (Häussinger *et al.*, 1999, Meijer & Codogno, 2006, Wullschleger *et al.*, 2006). Die Phosphorylierung weiterer Proteine durch die mTOR-Kinase führt zu einer Inhibierung der autophagischen Proteolyse (siehe Einleitung, Kapitel 1.3.4.4, Abbildung 7). Rapamycin inhibiert die Kinaseaktivität von mTOR, wodurch es zu einer Induktion der Autophagie kommt (Blommaart *et al.*, 1997).

Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die mTOR-Aktivität in $G\alpha_{i3}$ -defizienten Hepatozyten dysreguliert zu sein scheint. So weisen $G\alpha_{i3}$ -defiziente Hepatozyten unter normalen, Nährstoff-reichen Kulturbedingungen eine erhöhte mTOR-Aktivität auf (Abbildung 25). Diese Daten legen nahe, dass $G\alpha_{i3}$ in die Regulierung der Nährstoffe-medierten oder durch Rapamycin-medierten mTOR-Kinaseaktivität eingebunden ist. Wie ist dies zu erklären?

Die mTOR-Kinase bildet mit Raptor und G β L einen Nährstoff- sowie Rapamycin-sensitiven makromolekularen Komplex, der als mTORC1 = *mammalian target of rapamycin complex 1* bezeichnet wird. In dieser Hinsicht sind Daten aus der Arbeitsgruppe von Sabatini interessant (Kim *et al.*, 2003), die zeigen, dass G β L ein wichtiger Regulator des Rapamycin-sensitiven mTORC1-Komplexes darstellt und eine Funktion in der Nährstoff-medierten Assoziation von mTOR und Raptor besitzt.

G β L sowie Raptor besitzen eine G β -Faltblatt-ähnliche Struktur mit sieben WD40-*repeats* (Rodgers *et al.*, 2001). Proteine mit WD40-*repeat*-Motiven können Proteine rekrutieren und oftmals multimere Komplexe bilden (Smith *et al.*, 1999). G β L bindet an die mTOR-Kinase-Domäne und stimuliert die Kinaseaktivität. Unter Nährstoff-armen Bedingungen kommt es jedoch zu einer starken Bindung von Raptor an G β L und an die mTOR-Kinasedomäne. Das führt zu einer Inhibierung der von G β L ausgehenden Aktivierung der mTOR-Kinase. Im Gegensatz dazu erfolgt unter Nährstoff-reichen Bedingungen eine verminderte Bildung des Raptor-G β L-mTOR

Komplexes. Daraus resultiert die stimulierende Wirkung von G β L auf die mTOR-Kinaseaktivität (siehe hierzu Abbildung 35A).

Möglich ist eine Rekrutierung von bisher noch unbekannten zellulären Komponenten an den mTOR Kinase-Komplex. Diese Komponenten, zu denen möglicherweise G α_{i3} zählt, könnten in der Weiterleitung von Signalen zum TOR-Komplex involviert sein, oder G β L und/oder Raptor so modifizieren, dass dies eine Veränderung in der Affinität zwischen den Bindungen von Raptor/mTOR und G β L und, falls G α_{i3} im Komplex mit G β L vorliegen könnte, eine Konformationsänderung des mTOR-Komplexes zur Folge haben könnte. Ein Schema über einen möglichen Einfluß von G α_{i3} auf die Raptor/G β L-Funktion ist in Abbildung 35A dargestellt.

Ist G α_{i3} in der Rapamycin-mediierten Inhibierung der mTOR-Kinase involviert? G α_{i3} -defiziente und mit Rapamycin behandelte Hepatozyten weisen neben einer veränderten mTOR-Kinaseaktivität in präliminären Daten auch auf eine verringerte LC3-I- zu LC3-II-Prozessierung hin (Abbildung 24). Rapamycin bildet mit FK506 binding protein 12 kDa (FKBP12) einen FKBP12-Rapamycin-Komplex und destabilisiert unabhängig von Nährstoffbedingungen, die Raptor-mTOR-Bindung. FKBP12-Rapamycin bindet an die FKBP12-rapamycin binding (FRB)-Domäne, welche direkt N-terminal an die mTOR-Kinasedomäne grenzt, an die G β L bindet. Die Kopplung FKBP12-Rapamycin an FRB imitiert die hemmende Wirkung von Raptor, wenn dieser unter Nährstoff-armen Bedingungen an G β L bindet. Dies verhindert eine von G β L ausgehende Aktivierung der mTOR-Kinase und erklärt so die inhibierende Wirkung von Rapamycin (Kim *et al.*, 2003).

Nährstoffe und Rapamycin können nur dann eine Wirkung auf den mTOR-Komplex ausüben, wenn G β L am mTOR-Komplex gebunden vorliegt (Kim *et al.*, 2003). Die Immunofluoreszenzfärbungen von wildtypischen Hepatozyten mit den gegen G α_{i3} -gerichteten Antikörper im Ergebnisteil, Kapitel 4.1.7, Abbildung 23 zeigen die zytoplasmatische, endosomale Lokalisation von G α_{i3} unter verschiedenen Kulturbedingungen. Anders als bei einer durch Hungerung-induzierten autophagischen Proteolyse, findet bei in Rapamycin behandelten Zellen keine Re-Lokalisation des zytoplasmatisch verteilten G α_{i3} an perinukleäre Vesikel statt (Abbildung 23; unterste Reihe). Diese Beobachtung lässt auf eine Funktion von G α_{i3} schließen, die signalaufwärts oder auf der gleichen Ebene von mTOR zu liegen scheint (schematisch dargestellt in Abbildung 35B).

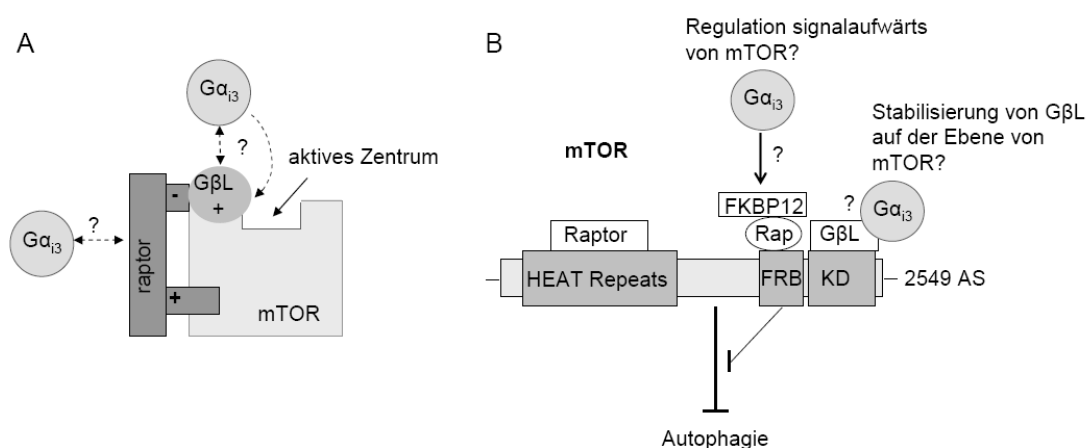


Abbildung 35. Modell einer möglichen von $G\alpha_{i3}$ ausgehenden regulierenden Funktion der mTOR-Kinase

(A) Raptor = *regulatory associated protein of mTOR*; G β L = *G-protein β subunit like protein*; mTOR = *mammalian target of rapamycin*. Raptor bildet eine Nährstoff-empfindliche Interaktion mit G β L, das an die mTOR-Kinase-Domäne knüpft (Kim *et al.*, 2003). Die Bindung von Raptor an G β L, die von Nährstoff-armen Bedingungen induziert wird, könnte die positive Funktion von G β L auf die mTOR-Kinaseaktivität hemmen. Nährstoff-reiche Bedingungen schwächen die Raptor Interaktion, mit der Folge, dass Raptor keine hemmende Funktion auf G β L ausüben kann und es somit zu einer Aktivierung der mTOR-Kinase kommt. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Regulation der mTOR-Aktivität in G α_{i3} -defizienten Hepatozyten verändert ist (siehe Kapitel 4.1.7.). Das dargestellte Modell zeigt eine mögliche Assoziation von G α_{i3} mit Raptor und/oder G β L, welche für das Gleichgewicht des Nährstoff-empfindlichen mTOR-Komplexes wichtig sein könnte.

(B) Raptor = regulatory associated protein of mTOR, HEAT = Huntingtin elongation factor 3 PR65/A subunit of protein phosphatase 2A and the TOR lipid kinase, FRB = FKBP12-rapamycin binding, FKBP12 = FK506 binding protein of 12 kDa, Rap = Rapamycin, GβL = G-protein β subunit like protein, KD = Kinasedomäne, AS = Aminosäure. In der vorliegenden Arbeit ließ sich bei Abwesenheit des Proteins $G\alpha_{i3}$ in Hepatozyten keine Rapamycin-vermittelte Autophagie induzieren. Besitzt $G\alpha_{i3}$ eine regulierende und/oder stabilisierende Funktion im mTOR-Komplex? Näheres siehe Text.

Die Aktivierung von $G\alpha_{i3}$ über die GEF-Funktion von GIV, siehe vorheriges Kapitel 5.2.1, scheint eine Rolle in der anti-autophagischen Wirkung von Insulin und Wachstumsfaktoren wie *epidermal growth factor* (EGF), die über mTOR vermittelt werden, zu spielen. Hierbei scheint $G\alpha_{i3}$, wie auch $G\alpha_{i1}$, mit dem EGF-Rezeptor assoziiert zu sein (Cao *et al.*, 2009, Ghosh *et al.*, 2010). Eine defekte GEF-Funktion und somit eine beeinträchtigte Aktivierung bzw. Bindung von $G\alpha_{i3}$ an GIV führte zu Inhibierung der anti-autophagischen Klasse I PI3-Kinase-Akt-mTOR-Signalkaskade und zur Aktivierung der pro-autophagischen Ras/Raf/MEK/ERK1/2-Signalkaskade (Cao *et al.*, 2009, Garcia-Marcos *et al.*, 2011, Ghosh *et al.*, 2010). Das Equilibrium zwischen $G\alpha_{i3}$ -GTP und $G\alpha_{i3}$ -GDP könnte also eine regulierende, in Balance haltende Wirkung/Inhibierung auf die mTOR Aktivität ausüben.

Experimentelle Versuche wie z. B. Immunpräzipitationen mit dem spezifischen α_{i3} Antikörper unter verschiedenen Bedingungen (z. B. +/- Rapamycin, siRNA gegen

G β L, Raptor, mTOR) könnten weitere Aufschlüsse darüber geben, ob G α_{i3} an den mTOR-Komplex rekrutiert wird und ob und in welchem Umfang G α_{i3} in der Regulierung der mTOR-Kinase involviert ist. Abbildung 36 zeigt schematisch mögliche Interaktionen von G α_{i3} in der autophagischen Proteolyse.

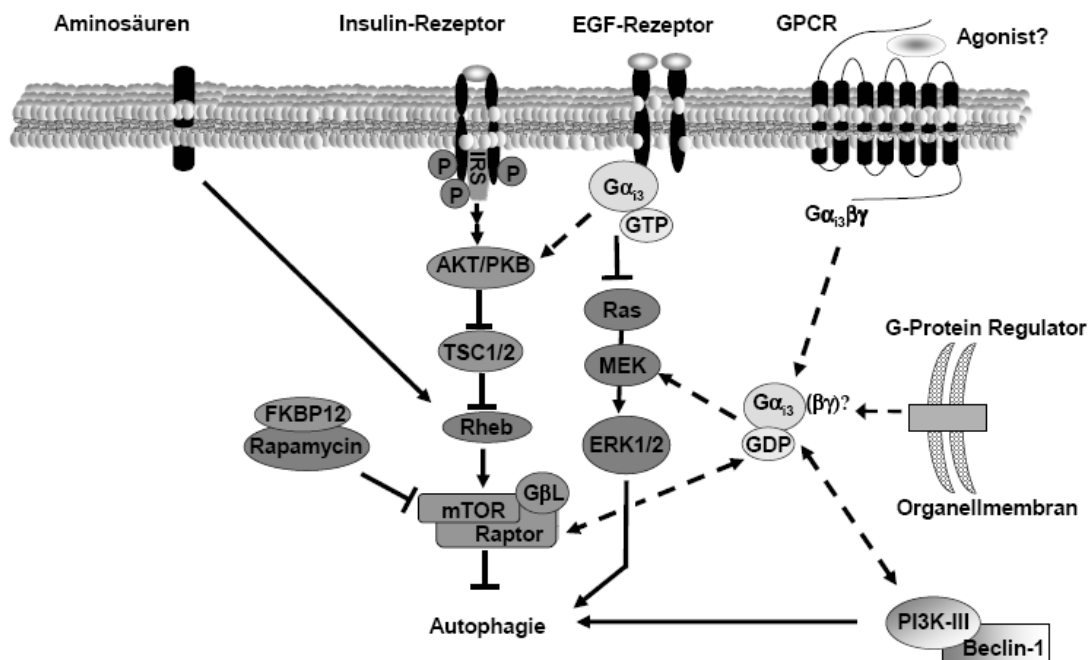


Abbildung 36. Modell möglicher Funktionen von G α_{i3} in autophagischen Signaltransduktionswegen

GPCR = G-protein-coupled receptor; IRS = insulin receptor substrate; EGF = *epidermal growth factor*; AKT/PKB = protein kinase B; TSC1/2 = tuberous sclerosis protein 1/2; Rheb = Ras homolog enriched in brain; FKBP12 = FK506 binding protein of 12 kDa; G β L = G-protein β subunit like protein; Raptor = *regulatory associated protein of mTOR*; PI3K-III = Phosphatidylinositol 3-kinase class III; MEK = *Mitogen-activated protein kinase kinase*; ERK1/2 = *Extracellular-signal Regulated Kinases*. Die anti-autophagische Wirkung von Insulin wird über Akt, TSC1/2, Rheb und die mTOR-Kinase mediert. G α_{i3} könnte mit mTOR-Signalweg interagieren und ggfls. darüber in der anti-autophagischen Wirkung von Insulin und Aminosäuren involviert sein. Mögliche Verbindungen stellen die gestrichelten Linien dar.

5.3 Phänotypische Merkmale von G α_{i3} -defizienten Mäusen

In der vorliegenden Arbeit konnte auf zellulärer Ebene mit mehreren zellbiologischen und biochemischen Ansätzen gezeigt werden, dass G α_{i3} eine Funktion in der Regulierung und der Signalweiterleitung von autophagischen Prozessen besitzt. Um die Auswirkungen einer G α_{i3} -Defizienz im lebenden Organismus unmittelbar und über die Lebensspanne der Mäuse beschreiben zu können, wurde ein Schwimmtest, um die Kondition bzw. die physische Aktivität der Tiere zu beurteilen und eine Langzeitstudie durchgeführt.

5.3.1 Verminderte Aktivität von $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen

Eine verminderte Aktivität der $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse während der nachtaktiven Phase zeigen die Ergebnisse aus dem forcierten Schwimmtest (Kapitel 4.2.2). In diesem Experiment zeigten die $G\alpha_{i3}$ -deletierten Mäuse im Wasser eine um fast 36 % größere Immobilität als die wildtypischen Kontrolltiere (Abbildung 27). Auch zeigen Daten, die zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Ruth am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen generiert wurden, dass $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse während der nachtaktiven Phase einen gegenüber Wildtyp-Kontrolltieren fast um die Hälfte reduzierten Bewegungsindex hatten (siehe Anhang, Kapitel 9.4). Dagegen wiesen $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse tagsüber im Ruhezustand gegenüber Kontrolltieren signifikant höhere arterielle Blutdruckwerte (MAP) sowie eine auffallend erhöhte basale Herzrate auf.

Die verminderte physische Aktivität der $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse kann verschiedenste Ursachen haben u. a. vielleicht auch auf eine dysregulierte Autophagie in diesen Tieren hinweisen (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.1.5) und ist somit auf eine durch die autophagische Proteolyse verminderte Energiebereitstellung zurück zu führen. Jedoch diese alleinige Beobachtung der verminderten physischen Aktivität lässt keinen Rückschluß über die Verwertung von Nährstoffen schließen – hierzu bedarf es weitere umfangreichere Untersuchungen.

Bislang gibt es keine Studien, in denen die phänotypischen Veränderungen von $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen im Vergleich zu den wildtypischen Kontrolltieren aufgezeichnet wurden. Eine Langzeitbeobachtung wurde erstmalig mit dieser Arbeit durchgeführt.

5.3.2 Vermindertes Körpergewicht und verminderte Fetteinlagerung bei $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen

In der Langzeitstudie besaßen die $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuse im Vergleich zu den wildtypischen Kontrolltieren ein tendenziell verringertes Körpergewicht (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.2.3.1, Abbildung 28). Die Ursache für diese unterschiedliche Gewichtsentwicklung zwischen den $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen und den wildtypischen Vergleichstieren kann mannigfaltig sein und lässt sich ohne grundlegendere Untersuchungen ungenügend erklären. Hierbei muss beachtet werden, dass die Langzeitstudie der Tiere v. a. angelegt wurde, um die Lebensdauer von Wildtyp- *versus* vs. $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen zu dokumentieren. Die Untersuchungen zur

Gewichtsentwicklung sind als zusätzliche Erkenntnisse zu interpretieren und waren nicht im Fokus dieser Studie. Da die insgesamt 80 Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten geboren wurden, resultierten aus der monatlichen Wägung unterschiedliche Körpergewichte zu unterschiedlichen Lebensstagen. Die Angabe des Alters in Tagen auf der Abzisse sowie das Gewicht der Tiere auf der Ordinate in der dargestellten Abbildung 28 (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.2.3.1) stellen daher jeweils Mittelwerte dar. Weiterhin kann es auch relevant sein, dass die 80 untersuchten Mäuse in einem relativ engen Zeitraum geboren wurden und nicht kontinuierlich über das ganze Jahr. Diese Punkte bringen eine gewisse Unschärfe mit sich und beeinträchtigen ggfls. die Aussagekraft der Ergebnisse.

Geringeres Körpergewicht scheint eine häufige Gemeinsamkeit von gendefizienten Mäusen zu sein. Basierend auf einem Datensatz von 1977 *knockout*-Mausstämmen, zeigte eine Studie (Reed *et al.*, 2008), dass etwa 31 % der generierten, lebensfähigen *knockout*-Mausstämme ein geringeres Körpergewicht aufwiesen als die Mäuse in den jeweiligen Kontrollgruppen. Nur 3 % der Mäuse dieser untersuchten gendefizienten Stämme wogen mehr als die Mäuse in der Vergleichsgruppe. Der Studie zufolge können schätzungsweise mehr als 6000 Gene das Körpergewicht beeinflussen. Aus diesem Grund wäre von besonderem Interesse, die Stoffwechselaktivität der $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen systematisch in einer Studie zu erforschen.

Neben einem geringeren Körpergewicht wiesen zum Zeitpunkt ihres Todes die $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuse auch kaum abdominale und subkutane Fetteinlagerungen im Vergleich zu den Kontrolltieren auf (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.2.3.2). Um den Gewichtsunterschied als auch den Unterschied in der Körperfettmasse zwischen den beiden Tierkohorten ursächlich genauer zuordnen zu können, müsste generell die Nahrungsaufnahme und -verwertung der Mäuse, z. B. durch eine kontrollierte Haltung in einem metabolischen Käfig, untersucht werden. Hier wäre auch eine Fütterung der Mäuse mit einer hochkalorischen Kost interessant, um zu erkennen ob diese Mäuse z. B. resistent gegen ernährungsbedingte Fettleibigkeit wären. Auch der Energieumsatz der Tiere müsste betrachtet werden. Denn allein die Beobachtungen aus den Untersuchungen der kardiovaskulären Parameter (siehe Anhang, Kapitel 9.4, Abbildung 41) und des Konditionstests (forcierter Schwimmtest, siehe Ergebnisse, Kapitel 4.2.2, Abbildung 27), die zeigen, dass $G\alpha_{i3}$ -defiziente Tiere während der nachtaktiven Phase eine verminderte physische Aktivität aufweisen, lässt noch keinen Rückschluss auf den Energieumsatz und die Verwertung von Nährstoffen dieser Tiere zu. Die geringere Körperfettmasse in den $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Tieren könnte zum einen an einer erniedrigten

Nahrungsaufnahme, zum anderen an einem erhöhten Energieumsatz liegen. Hier müsste bei zukünftigen Untersuchungen also durch die indirekte Kalorimetrie über die Bestimmung der Atemgase (Sauerstoffaufnahme und Kohlenstoffdioxidabgabe) der Energieumsatz berechnet werden.

Ohne genauere Aussagen über den Energieumsatz und die Art der Fettmasse (braunes/weißes Fettgewebe) der $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäuse machen zu können, lassen sich dennoch Überlegungen aufstellen inwieweit die Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$ mit einem erniedrigten Körpergewicht und –fettmasse zusammenhängen könnte. Ein wichtiger Punkt scheint hier die Bildung der Autophagosomenmembran zu sein. So wurde gezeigt, dass eine Verbindung zwischen dem Fehlen des Proteins Atg5, das mit Atg12 einen Komplex bildet (siehe Einleitung, Kapitel 1.3.4.2) und essentiell für die Bildung der Autophagosomenmembran ist, und einer erniedrigten Adipogenese (Baerga *et al.*, 2009) besteht. Hierbei scheint vor allem die Expansion des weißen Fettgewebes, das v. a. für die Speicherung von Fett und als Energielieferant dient, Atg5-abhängig zu sein. Atg5-defiziente Embryonen zeigten in dieser Studie bereits im embryonalen Endstadium eine verringerte Anzahl subkutaner Fettzellen. In Hepatozyten lokalisiert LC3-II an Lipidtröpfchen und fördert deren Fusion. Das LC3-Konjugationssystem, also die Prozessierung von zytosolischem LC3-I in die Autophagosomenmembran-assoziierte LC3-II-Form, scheint für die Bildung von Lipidtröpfchen essentiell zu sein (Shibata *et al.*, 2009, Singh *et al.*, 2009). In Abwesenheit von Atg5 unterbleibt die LC3-Prozessierung, sodass LC3 nicht an die Lipidtröpfchen der Adipozyten translozieren kann und somit die Fusion der Lipidtröpfchen beeinträchtigt ist. Die Ursache für die beeinträchtigte Adipogenese in Atg5-defizienten Mäusen scheint also die Atg5-abhängige Lipidmodifikation von LC3 sein. Wie bereits diskutiert wurde (siehe Kapitel, Diskussion 5.2.1), ist für die Ausbildung von Präautophagosomen und deren Reifung in Autophagosomen die Lokalisation des $G\alpha_{i3}$ -AGS3-Komplexs an die Membranen von LC3-positiven Vesikeln wichtig (Garcia-Marcos *et al.*, 2011, Meijer & Codogno, 2004). Darüberhinaus scheint bei Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$ die Prozessierung von LC3-I in LC3-II beeinträchtigt zu sein. Diese Ergebnisse könnten der Grund für die Veränderung im Lipidmetabolismus bzw. der Adipogenese der $G\alpha_{i3}$ -defizienten Tiere sein. Um diese Hypothese näher untersuchen zu können, wären Untersuchungen zur Adipogenese und der Verlauf der Adipogenese erforderlich.

Verringertes Fettgewebe in $G\alpha_{i3}$ -deletierten Mäusen könnte auch durch eine gesteigerte Lipolyse hervorgerufen worden sein. So gibt es Studien in einer Reihe von Tiermodellen die zeigen, dass jede Störung, die zu einer erhöhten cAMP-Bildung im

Fettgewebe führt, einen schlanken, Fettleibigkeit-resistenten Phänotyp zeigt. So zeigen AGS3-deletierte Mäuse ein gegenüber Kontrolltieren verringertes Körpergewicht, reduziertes (weißes) Fettgewebe und einen erhöhten nächtlichen Energieumsatz auf bei zu Kontrolltieren vergleichbaren Blutglukose-, Cholesterin- und Triglyzeridwerten (Blumer *et al.*, 2008). Die Autoren vermuten, dass das fehlende AGS3-Protein, das als Aktivator und Modulator von $G\alpha_i$ -Proteinen gilt, eine gestörte $G\alpha_i$ -Signalweiterleitung mit sich bringt und anschließend Signale verstärkt, die zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration in Adipozyten und letztlich zu einer Lipolyse führen. Fehlt das $G\alpha_{i3}$ -Protein, das ansonsten einen inhibierenden Effekt auf die intrazelluläre cAMP-Bildung ausübt, könnte dies der Grund für eine erhöhte Lipolyse im Fettgewebe darstellen.

5.3.3 Vorzeitiges Ergrauen des Fells bei $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen

Weiterhin zeigen unsere Daten, dass $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse in der Langzeitstudie im Vergleich zu den wildtypischen Kontrolltieren ein früheres Ergrauen des Fells aufwiesen. Die Versorgung von Melanin in Keratinozyten ist essentiell für die Pigmentierung von Haut und Fell (Wasmeier *et al.*, 2008). Melanosomen sind endosomal-lysosomal entstandene Organellen die für die Synthese, Lagerung und den Transport des Melanins zuständig sind. Ein Defekt in der Reifung und im Transport dieser Organellen führt zu einer dysregulierten Pigmentierung (Di Pietro *et al.*, 2006, Gautam *et al.*, 2006, Shibata *et al.*, 2009, Singh *et al.*, 2009). Fast ein Drittel aller $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuse wiesen bereits mit 12 Monaten ein graues, struppiges Fell auf. Die wildtypischen Kontrolltiere zeigten in diesem Alter keine Auffälligkeiten (siehe Ergebnisse, Kapitel 4.2.3.3). Auch im späteren Alter bis zum Tod wiesen etwa 70 % der $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuse und nur etwa 28 % der Wildtyp-Mäuse ein graues Fell auf. Kommt es bei Fehlen des Proteins $G\alpha_{i3}$ zu einer beeinträchtigten Bildung und Transport von Melanin in Melanosomen? Die Arbeitsgruppe von Prof. Debora Farber in Kooperation mit Prof. Lutz Birnbaumer zeigten in ihren Studien über den okulären Albinismus Typ 1 (OA1), dass OA1, ein GPCR welcher auf Melanosomen lokalisiert ist, mit $G\alpha_{i3}$ in der Regulierung der Melanosomenbiogenese involviert ist (Young *et al.*, 2011, Young *et al.*, 2008). Hierbei zeigten sie in ihren Studien, dass die Anzahl der Photorezeptoren in der Netzhaut der $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuse denen der Kontrollmäuse gleich, jedoch die Anzahl der Melanosomen des retinales Pigmentepithels (RPE) signifikant geringer war. Auch in $G\alpha_{i3}$ -defizienten RPE-Zellen gab es eine geringere

Anzahl aber vergrößerte Melanosomen verglichen mit den Melanosomen in wildtypischen RPE-Zellen. Die Autoren postulieren, dass $G\alpha_{i3}$ eine Rolle beim Transport der Melanin-enthaltenen Vesikel vom trans-golgi-Netzwerk zu Melanosomen spielt und das Fehlen von $G\alpha_{i3}$ zu einer aberranten Bindung oder Fusion von Vesikeln mit Melanin oder melanosomalen Proteinen führt, welche wichtig für die Biogenese von Melanosomen ist. Weiterhin konnten sie belegen, dass die von $G\alpha_{i3}$ ausgehende Funktion nicht durch die eng verwandten $G\alpha_i$ -Isoformen $G\alpha_{i2}$ oder $G\alpha_{i1}$ kompensiert werden konnte. OA1 ist nicht nur stark im RPE exprimiert, sondern auch in geringerem Maße in Hautmelanozyten. Die Tatsache, dass die Autoren nichts über auftretende Haut-/Fellveränderungen der untersuchten OA1- und $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuse berichten, könnte daran liegen, dass deren untersuchten Tiere im Alter von zwei bis sechs Monaten waren. Vielleicht machen sich Defekte in der Biogenese der Melanosomen erst ab einem späteren Zeitpunkt bemerkbar, denn in der vorliegenden Arbeit war die Fellveränderungen erst ab dem 12. Lebensmonat zu beobachten.

5.3.4 Längere Lebensdauer von weiblichen $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen

Die Lebensdauer der $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuse in der Langzeitstudie ist mit 775 ± 32 Tagen (Median = 832 Tage) signifikant höher als die Lebensdauer der Wildtyp-Kontrolltiere (750 ± 24 Tage; Median = 767 Tage; $p = 0,03$) (Ergebnisse, Kapitel 4.2.3.4). Dies liegt v. a. daran, dass die weiblichen $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuse signifikant länger lebten im Vergleich zu den männlichen $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen sowie den weiblichen Wildtyp-Mäusen (Abbildung 32). Bei den männlichen Tieren (Wildtyp *versus* $G\alpha_{i3}^{-/-}$) ist hingegen kein Unterschied zu verzeichnen. Ob die Zunahme der mittleren Lebenserwartung im kausalen Zusammenhang mit dem Geschlecht und Genotyp der Tiere steht, muss durch eine ausgeweitete Studie mit einer größeren Kohorte an Versuchstieren ermittelt werden.

Die Auswirkungen von Genmanipulationen machen sich oftmals in laborchemischen Parametern bemerkbar, weshalb die Seren von $G\alpha_{i3}$ -defizienten sowie von wildtypischen Mäusen auf einige klinisch-chemische Parameter untersucht wurden. Eine Aussage über Unterschiede zwischen den mutanten und wildtypischen Tieren konnte nicht gemacht werden. Dies liegt darin begründet, dass aus jeder Tiergruppe nur die Daten von jeweils 11 – 15 Tieren ausgewertet werden konnten. Die Haltungsbedingungen mit einer definierten Keimflora ohne Einflüsse von aussen, ließen eine mehrfache Blutentnahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten nicht zu. Durch die

einmalige Blutentnahme zum Todeszeitpunkt des jeweiligen Tieres konnten die Daten nicht in Kohorten zusammengefasst und altersabhängig ausgewertet werden. Die Untersuchung der Blutwerte sollte eine Zusatzinformation zur Gewichtsentwicklung und Lebensdauer darstellen. Generell zeigt die Studie, dass eine mehrfache und zu definierten Zeitpunkten durchgeführte Untersuchung der Seren, sowie Durchführung mit einer größeren Anzahl an Tieren einen besseren und aussagekräftigeren Vergleich der Tiere zulässt. Dies wäre gerade im Hinblick auf mögliche Unterschiede im Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel besonders interessant.

Die untersuchten Parameter wie Aktivität, Körpergewicht, Kondition, Mortalität, Fellfärbung etc. liefern eindrucksvolle Ergebnisse und stellen einen Anfang bei der Charakterisierung der $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuse dar. Um Rückschlüsse ziehen zu können, welche molekularen Zusammenhänge vorliegen, müssten diese präliminären Daten durch eine Langzeitstudie an einer größeren Kohorte verifiziert werden. Weitergehende Erkenntnisse erhielte man, wie bereits erwähnt z. B. durch die Haltung der Tiere in metabolischen Käfigen. Weitere, umfangreichere Untersuchungen sind daher unabdingbar um die funktionelle Rolle von $G\alpha_{i3}$ im Organismus beschreiben zu können.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Erkenntnisse über die Regulierung der Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCR) sind von enormer Bedeutung im Hinblick auf das Verständnis von Krankheiten und die Entwicklung von Medikamenten. Ungefähr 30 % – 40 % aller modernen Medikamente und etwa 25 % der 200 bestverkauften Arzneimittel modulieren die GPCR-Aktivität. G-Proteine, die als Transduktoren die Signale von den GPCRs an intrazelluläre Effektorensysteme weiterleiten, besetzen hierbei eine Schlüsselposition in vielen Signalkaskaden u. a. in der autophagischen Proteolyse. Schon vor 20 Jahren wurde durch Untersuchungen an permeabilisierten Rattenhepatozyten eine Beteiligung von GTP-bindenden Proteinen in der autophagischen Sequestrierung gefunden (Kadowaki et al., 1994).

Die Autophagie ist ein Prozess, bei dem u. a. Proteine mit Hilfe von Autophagosomen abgebaut werden um eine Energieversorgung des Organismus unter extremen Bedingungen, wie z. B. Nahrungsmangel, sicherzustellen. Die autophagische Proteolyse stellt dabei einen wichtigen katabolen Mechanismus in Leberzellen dar. Eine Vielzahl von Stressbedingungen können Autophagie auslösen und eine Reihe von Signalwegen ist an ihrer Regulation beteiligt. So stellen Aminosäuren, Insulin und ATP negative Regulatoren des autophagischen Proteinabbaus dar. Hierbei verläuft die Insulin-induzierte Hemmung der Autophagie über PI3-Kinasen der Klasse I-Familie und der Serin/Threonin-Kinase mTOR. Auch die Hemmung der Autophagie durch Aminosäuren und ATP wird durch die Aminosäure- und ATP-Sensor-Kinase mTOR mediert.

Obwohl die präzisen molekularen Mechanismen, die zur Aktivierung und Inhibition der Autophagie führen, größtenteils noch nicht aufgeklärt sind, ist bekannt, dass heterotrimere G-Proteine der Pertussistoxin-sensitiven G_i -Familie in der Autophagie involviert sind. Ein primäres Ziel dieser Arbeit war es daher, die Beteiligung der in der Leber exprimierten $G\alpha_i$ -Proteine, $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$, an der Regulation der hepatischen Autophagie zu charakterisieren, um so grundlegende Einblicke in die Mechanismen der autophagischen Proteolyse zu erhalten. Hierzu wurden tierexperimentelle Untersuchungen mit konstitutiv G_i -defizienten Mäusen durchgeführt, sowie Hepatozyten und embryonale Fibroblasten dieser Tiere charakterisiert.

1) In Vorarbeiten zu dieser Dissertation wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Häussinger (Universitätsklinikum Düsseldorf) die autophagische Aktivität in der Leber mittels *In-situ*-Leberperfusion untersucht. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass $G\alpha_{i3}$, nicht aber das in der Leber quantitativ vorherrschende $G\alpha_{i2}$, eine Rolle in der durch Insulin- und Aminosäure-vermittelten Hemmung der Autophagie spielt. Dieser Befund zeigt, dass $G\alpha_{i3}$ eine obligate Funktion bei der Weiterleitung anti-autophagischer Stimuli signalabwärts von Insulin- und Aminosäure-induzierten Signalwegen besitzt. Um diese Befunde auf die zelluläre Ebene übertragen und weitere Untersuchungen zu den Mechanismen durchführen zu können, wurden experimentelle Werkzeuge wie polyklonale $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -spezifische Antikörper entwickelt und charakterisiert sowie die Isolierung und Kultivierung von murinen Hepatozyten im Labor etabliert.

2) Mit Hilfe dieser Werkzeuge und anhand konfokaler Laserscanning-Mikroskopie konnte erstmals gezeigt werden, dass die subzelluläre Verteilung von $G\alpha_{i3}$ vom metabolischen Status der Zelle abhängt. Während $G\alpha_{i3}$ unter Nährstoff-reichen Kulturbedingungen diffus in der Zelle verteilt ist, akkumuliert $G\alpha_{i3}$ nach Induktion der Autophagie sowohl an der Plasmamembran als auch an LC3-positiven Autophagosomen. Darüber hinaus kolokalisiert $G\alpha_{i3}$ teilweise auch mit frühen Endosomen, Lysosomen und mit Teilen des endoplasmatischen Retikulums. In einem unabhängigen Ansatz wurde mittels subzellulärer Fraktionierung von Mausembryonalfibroblasten und Hepatozyten biochemisch überprüft, ob $G\alpha_{i3}$ mit Autophagosomen assoziiert ist. Hierzu wurden Autophagosomen via Dichtegradienten-Zentrifugation von anderen Zellorganellen getrennt und mittels Immunoblot-Analyse untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl $G\alpha_{i3}$ als auch $G\alpha_{i2}$ erwartungsgemäß in der Plasmamembran-angereicherten Fraktion zu finden sind, dass $G\alpha_{i3}$, nicht jedoch $G\alpha_{i2}$, außerdem in der Autophagosomen-angereicherten Fraktion nachweisbar war. Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass die subzelluläre Lokalisierung von $G\alpha_{i3}$ vom metabolischen Status der Zellen abhängt und legen darüber hinaus nahe, dass $G\alpha_{i3}$ eine bisher nicht bekannte Funktion auf autophagosomalen Membranen ausübt.

3) Bei $G\alpha_{i3}$ -defizienten Hepatozyten und Mausembryonalfibroblasten wurde gezeigt, dass die Prozessierung des Autophagie-Markerproteins LC3 von der zytosolisch lokalisierten LC3-I-Form zur Autophagosomen-assoziierten LC3-II-Form beeinträchtigt ist. Dadurch ist die Expression von LC3-positiven Autophagosomen reduziert. Diese

Ergebnisse deuten auf eine Rolle von $G\alpha_{i3}$ im Rahmen der Autophagosomenbildung hin.

4) Die Serin/Threonin-Kinase mTOR, die einen negativen Regulator in der autophagischen Signalweiterleitung darstellt, ist bei Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$ dysreguliert. Eine Verteilung von zytoplasmatischem $G\alpha_{i3}$ an autophagische Vesikel fand nach Induktion der Autophagie mit dem mTOR Inhibitor Rapamycin nicht statt. Darüber hinaus scheint eine durch Rapamycin induzierte autophagische Proteolyse und somit eine Prozessierung von LC3-I in LC3-II in Abwesenheit von $G\alpha_{i3}$ beeinträchtigt zu sein. Diese Daten belegen, dass $G\alpha_{i3}$ in die Regulation der durch Nährstoffe- oder Rapamycin-medierten mTOR-Kinaseaktivität involviert ist.

5) Parallel zu den Untersuchungen auf zellulärer Ebene wurden tierexperimentelle Untersuchungen an $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen sowie eine zweijährige Langzeitbeobachtung von C57BL/6 konstitutiv $G\alpha_{i3}$ -defizienten sowie Wildtyp-Mäusen unter kontrollierten Bedingungen durchgeführt. Im Rahmen dieser Studie konnte bei $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen ein im Vergleich zur Kontrollgruppe geringeres Körpergewicht, eine geringere Ansammlung von Fettgewebe, eine längere Lebenszeit sowie ein früheres Fellergrauen beobachtet werden. Des Weiteren zeigte sich eine verminderte physische Aktivität von $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Kontrolltieren.

Die vorliegenden Daten in Verbindung mit den durch Garcia-Marcos und Kollegen (Garcia-Marcos *et al.*, 2011) erhaltenen experimentellen Ergebnissen, zeigen die Bedeutung von $G\alpha_{i3}$ für die Regulation der Autophagie im gesamten Organismus. Garcia-Marcos *et al.* zeigen, dass die $G\alpha_{i3}$ -Aktivität durch GIV und AGS3 reversibel gesteuert wird und sie damit das empfindliche Gleichgewicht zwischen einer Induktion und Inhibierung der Autophagie modulieren können.

Mit diesen Erkenntnissen können zielgerichtete Forschungen an einigen Krankheiten wie Krebs, neurodegenerativen sowie kardiovaskulären Krankheiten durchgeführt werden, bei denen u. a. eine dysregulierte Autophagie eine pathophysiologische Schlüsselrolle darstellt.

7 SUMMARY

Insights into the regulation of signaling via G protein-coupled receptors (GPCRs) are of enormous importance in terms of the understanding of diseases and the development of drugs. Approximately 30% - 40% of all modern drugs and about 25% of the 200 best-selling drugs modulate GPCR activity. G proteins, which transfer the signals from the GPCRs to intracellular effector systems, have a key position in many signaling cascades amongst others in autophagic proteolysis. Already 20 years ago studies on permeabilized rat hepatocytes have shown a participation of GTP-binding proteins in the autophagic sequestration (Kadowaki et al., 1994).

Autophagy is a process, in which amongst others, proteins are degraded by autophagosomes to ensure energy supply for the organism under extreme conditions such as food deprivation. The autophagic proteolysis represents an important catabolic mechanism in liver cells. A variety of stress conditions can induce autophagy and many signaling pathways are involved in its regulation. Thus amino acids, insulin and ATP are negative regulators of the autophagic protein degradation. Here, the insulin induced inhibition of autophagy signals via PI3 kinases of the class I family and the serine/threonine kinase mTOR. Also, the inhibition of autophagy by amino acids and ATP is mediated by the amino acid and ATP sensor kinase mTOR.

Although the precise molecular mechanisms that lead to activation and inhibition of autophagy mostly have not yet been elucidated, it is known that heterotrimeric G proteins of the pertussis toxin sensitive G_i family are involved in autophagy. A primary aim of this work therefore was to characterize the involvement of the $G\alpha_i$ proteins $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ expressed in the liver in the regulation of hepatic autophagy in order to obtain elementary insights into the mechanisms of autophagic proteolysis. For this, animal studies with constitutive G_i deficient mice have been performed, and hepatocytes and murine embryonic fibroblasts of these animals have been characterized.

1) In preliminary studies to this thesis the autophagic activity in the liver has been studied by *in situ* liver perfusion in collaboration with the research group of Prof. Häussinger (Universitätsklinikum Düsseldorf). It could be shown for the first time that $G\alpha_{i3}$, but not in the liver quantitatively predominant $G\alpha_{i2}$, plays a role in the insulin and amino acid mediated inhibition of autophagy. This finding shows that $G\alpha_{i3}$ has an obligatory role in transducing antiautophagic stimuli downstream of insulin and amino

acid induced signaling pathways. In order to transmit these findings to the cellular level and to carry out further studies on the mechanisms, experimental tools such as polyclonal $G\alpha_{i2}$ and $G\alpha_{i3}$ specific antibodies were developed and characterized as well as the establishment of the isolation and culture of murine hepatocytes in the laboratory.

2) Using these tools and based on confocal laser scanning microscopy it could be demonstrated for the first time that the subcellular distribution of $G\alpha_{i3}$ depends on the metabolic state of the cell. While $G\alpha_{i3}$ is distributed diffusely in the cell under nutrient rich culture conditions $G\alpha_{i3}$ accumulates both to the plasma membrane as well as to LC3 positive autophagosomes upon induction of autophagy. In addition, $G\alpha_{i3}$ colocalizes partially with early endosomes, lysosomes and with parts of the endoplasmic reticulum. In an independent approach it was tested biochemically by means of subcellular fractionation of murine embryonic fibroblasts and hepatocytes, whether $G\alpha_{i3}$ is associated with autophagosomes. Therefore autophagosomes were separated from other cell organelles via density gradient centrifugation and examined by means of immunoblotting analysis. It could be shown that both $G\alpha_{i3}$ as well as $G\alpha_{i2}$ were found in the plasma membrane enriched fraction as expected and that $G\alpha_{i3}$, but not $G\alpha_{i2}$, was also in autophagosome enriched fraction detectable. Taken together, these data demonstrate that the subcellular localization of $G\alpha_{i3}$ depends on the metabolic status of the cells and illustrate that $G\alpha_{i3}$ exerts an up to date unknown function on autophagosomal membranes.

3) In hepatocytes and murine embryonic fibroblasts deficient of $G\alpha_{i3}$ it has been shown that the processing of the autophagy marker protein LC3 from cytosolic localized LC3-I form to autophagosome associated LC3-II form is impaired. Thus, the expression of LC3 positive autophagosomes is reduced. These results depict a role for $G\alpha_{i3}$ in the autophagosome formation and fusion.

4) The serine/threonine kinase mTOR, which is a negative regulator in the autophagic signaling is dysregulated in the absence of $G\alpha_{i3}$. A distribution of cytoplasmic $G\alpha_{i3}$ to autophagic vesicles did not take place after induction of autophagy by the mTOR inhibitor rapamycin. In addition, autophagic proteolysis induced by rapamycin and thus processing of LC3-I into LC3-II seems to be impaired in the absence of $G\alpha_{i3}$. These data demonstrate that $G\alpha_{i3}$ is involved in the regulation of nutrient or rapamycin mediated mTOR kinase activity.

5) In parallel to the experiments at cellular level experimental analysis with $G\alpha_{i3}$ deficient mice have been done as well as a two year longterm observation of C57BL/6 of constitutively $G\alpha_{i3}$ deficient and wildtype mice was performed under controlled conditions. In this study, it could be observed that $G\alpha_{i3}$ deficient mice had a decreased body weight, a lower accumulation of adipose tissue, a longer lifetime and an earlier onset of the fur turning grey compared to the control group. Furthermore $G\alpha_{i3}$ deficient mice revealed reduced physical activity compared to wildtype control animals.

The present data in conjunction with those by Garcia-Marcos and colleagues (Garcia-Marcos et al., 2011) obtained results show the importance of $G\alpha_{i3}$ for the regulation of autophagy in the whole organism. The data generated from Garcia-Marcos *et al.* demonstrate that the $G\alpha_{i3}$ activity is reversibly controlled by GIV and AGS3 and thus modulate the delicate balance between an induction and inhibition of autophagy. With these findings, targeted research on some diseases such as cancer, neurodegenerative and cardiovascular diseases can be carried out, where, among other factors, a dysregulated autophagy represents a pathophysiological key role.

8 *LITERATURVERZEICHNIS*

Ahnert-Hilger, G., Nürnberg, B., Exner, T., Schafer, T., & Jahn, R. (1998). The heterotrimeric G protein Go2 regulates catecholamine uptake by secretory vesicles. *EMBO J.* 17, 406-413.

Arshavsky, V. Y. & Pugh, E. N., Jr. (1998). Lifetime regulation of G protein-effector complex: emerging importance of RGS proteins. *Neuron* 20, 11-14.

Authier, F. & Desbuquois, B. (2008). Glucagon receptors. *Cell Mol. Life Sci.* 65, 1880-1899.

Baba, M., Takeshige, K., Baba, N., & Ohsumi, Y. (1994). Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes and their characterization. *J. Cell Biol.* 124, 903-913.

Backer, J. M. (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem. J.* 410, 1-17.

Baerga, R., Zhang, Y., Chen, P. H., Goldman, S., & Jin, S. (2009). Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy* 5.

Bard, F. & Malhotra, V. (2006). The formation of TGN-to-plasma-membrane transport carriers. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 439-455.

Bastepe, M., Gunes, Y., Perez-Villamil, B., Hunzelman, J., Weinstein, L. S., & Juppner, H. (2002). Receptor-mediated adenylyl cyclase activation through XLalpha(s), the extra-large variant of the stimulatory G protein alpha-subunit. *Mol. Endocrinol.* 16, 1912-1919.

Belluscio, L., Gold, G. H., Nemes, A., & Axel, R. (1998). Mice deficient in G(olf) are anosmic. *Neuron* 20, 69-81.

Bergamini, E., Cavallini, G., Donati, A., & Gori, Z. (2007). The role of autophagy in aging: its essential part in the anti-aging mechanism of caloric restriction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1114, 69-78.

Berlin, S., Keren-Raifman, T., Castel, R., Rubinstein, M., Dessauer, C. W., Ivanina, T., & Dascal, N. (2010). G alpha(i) and G betagamma jointly regulate the conformations of a G betagamma effector, the neuronal G protein-activated K⁺ channel (GIRK). *J. Biol. Chem.* 285, 6179-6185.

- Berman, D. M., Kozasa, T., & Gilman, A. G. (1996). The GTPase-activating protein RGS4 stabilizes the transition state for nucleotide hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 271, 27209-27212.
- Bernard, M. L., Peterson, Y. K., Chung, P., Jourdan, J., & Lanier, S. M. (2001). Selective interaction of AGS3 with G-proteins and the influence of AGS3 on the activation state of G-proteins. *J. Biol. Chem.* 276, 1585-1593.
- Berry, M. & Edwards, A. (2000). *The Hepatocyte Review*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Berry, M., Edwards, A., & Barritt, G. (1991). *Isolated Hepatocytes Preparation, Properties and Applications (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology)* Elsevier Publishing Company.
- Bessemers, M., 't Hart, N. A., Tolba, R., Doorschodt, B. M., Leuvenink, H. G., Ploeg, R. J., Minor, T., & van Gulik, T. M. (2006). The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab Anim* 40, 236-246.
- Birnbaumer, L. (2007). Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 772-793.
- Birnbaumer, L., Abramowitz, J., & Brown, A. M. (1990). Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1031, 163-224.
- Blank, J. L., Ross, A. H., & Exton, J. H. (1991). Purification and characterization of two G-proteins that activate the beta 1 isozyme of phosphoinositide-specific phospholipase C. Identification as members of the Gq class. *J. Biol. Chem.* 266, 18206-18216.
- Blommaart, E. F., Krause, U., Schellens, J. P., Vreeling-Sindelarova, H., & Meijer, A. J. (1997). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* 243, 240-246.
- Blumer, J. B., Cismowski, M. J., Sato, M., & Lanier, S. M. (2005). AGS proteins: receptor-independent activators of G-protein signaling. *Trends Pharmacol. Sci.* 26, 470-476.
- Blumer, J. B., Lord, K., Saunders, T. L., Pacchioni, A., Black, C., Lazartigues, E., Varner, K. J., Gettys, T. W., & Lanier, S. M. (2008). Activator of G protein signaling 3 null mice: I. Unexpected alterations in metabolic and cardiovascular function. *Endocrinology* 149, 3842-3849.
- Blumer, J. B., Smrcka, A. V., & Lanier, S. M. (2007). Mechanistic pathways and biological roles for receptor-independent activators of G-protein signaling. *Pharmacol. Ther.* 113, 488-506.

Bockaert, J. & Pin, J. P. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18, 1723-1729.

Bokoch, G. M., Katada, T., Northup, J. K., Ui, M., & Gilman, A. G. (1984). Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J. Biol. Chem.* 259, 3560-3567.

Boland, B. & Nixon, R. A. (2006). Neuronal macroautophagy: from development to degeneration. *Mol. Aspects Med.* 27, 503-519.

Borchers, M. T., Biechele, T., Justice, J. P., Ansay, T., Cormier, S., Mancino, V., Wilkie, T. M., Simon, M. I., Lee, N. A., & Lee, J. J. (2003). Methacholine-induced airway hyperresponsiveness is dependent on Galphaq signaling. *Am. J. Physiol Lung Cell Mol. Physiol* 285, L114-L120.

Buhl, A. M., Johnson, N. L., Dhanasekaran, N., & Johnson, G. L. (1995). G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J. Biol. Chem.* 270, 24631-24634.

Calebiro, D., Nikolaev, V. O., Gagliani, M. C., de, F. T., Dees, C., Tacchetti, C., Persani, L., & Lohse, M. J. (2009). Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS. Biol.* 7, e1000172.

Calvert, P. D., Krasnoperova, N. V., Lyubarsky, A. L., Isayama, T., Nicolo, M., Kosaras, B., Wong, G., Gannon, K. S., Margolskee, R. F., Sidman, R. L., Pugh, E. N., Jr., Makino, C. L., & Lem, J. (2000). Phototransduction in transgenic mice after targeted deletion of the rod transducin alpha -subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 13913-13918.

Cao, C., Huang, X., Han, Y., Wan, Y., Birnbaumer, L., Feng, G. S., Marshall, J., Jiang, M., & Chu, W. M. (2009). Galpha(i1) and Galpha(i3) are required for epidermal growth factor-mediated activation of the Akt-mTORC1 pathway. *Sci. Signal.* 2, ra17.

Casey, P. J., Fong, H. K., Simon, M. I., & Gilman, A. G. (1990). Gz, a guanine nucleotide-binding protein with unique biochemical properties. *J. Biol. Chem.* 265, 2383-2390.

Casey, P. J. & Seabra, M. C. (1996). Protein prenyltransferases. *J. Biol. Chem.* 271, 5289-5292.

Chen, C. A. & Manning, D. R. (2001). Regulation of G proteins by covalent modification. *Oncogene* 20, 1643-1652.

Chen, D. & Zhong, Q. (2012). A tethering coherent protein in autophagosome maturation. *Autophagy* 8.

- Chen, F., Spicher, K., Jiang, M., Birnbaumer, L., & Wetzel, G. T. (2001). Lack of muscarinic regulation of Ca^{2+} channels in G(i2)alpha gene knockout mouse hearts. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 280, H1989-H1995.
- Chen, M., Nemechek, N. M., Mema, E., Wang, J., & Weinstein, L. S. (2011). Effects of deficiency of the G protein Gsalpha on energy and glucose homeostasis. *Eur. J. Pharmacol.* 660, 119-124.
- Cheong, H., Yorimitsu, T., Reggiori, F., Legakis, J. E., Wang, C. W., & Klionsky, D. J. (2005). Atg17 regulates the magnitude of the autophagic response. *Mol. Biol. Cell* 16, 3438-3453.
- Cho, Y. M., Merchant, C. E., & Kieffer, T. J. (2012). Targeting the glucagon receptor family for diabetes and obesity therapy. *Pharmacol. Ther.* 135, 247-278.
- Chung, S., Funakoshi, T., & Civelli, O. (2008). Orphan GPCR research. *Br. J. Pharmacol.* 153 Suppl 1, S339-S346.
- Cismowski, M. J., Takesono, A., Bernard, M. L., Duzic, E., & Lanier, S. M. (2001). Receptor-independent activators of heterotrimeric G-proteins. *Life Sci.* 68, 2301-2308.
- Clapham, D. E. & Neer, E. J. (1997). G protein beta gamma subunits. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 167-203.
- Clark, S. L. (1957). Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 3, 349-362.
- Codina, J., Grenet, D., Chang, K. J., & Birnbaumer, L. (1991). Urea gradient/SDS-PAGE; a useful tool in the investigation of signal transducing G proteins. *J. Recept. Res.* 11, 587-601.
- Codina, J., Hildebrandt, J., Iyengar, R., Birnbaumer, L., Sekura, R. D., & Manclark, C. R. (1983). Pertussis toxin substrate, the putative Ni component of adenylyl cyclases, is an alpha beta heterodimer regulated by guanine nucleotide and magnesium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80, 4276-4280.
- Codina, J., Hildebrandt, J. D., Birnbaumer, L., & Sekura, R. D. (1984). Effects of guanine nucleotides and Mg on human erythrocyte Ni and Ns, the regulatory components of adenylyl cyclase. *J. Biol. Chem.* 259, 11408-11418.
- Cook, L. A., Schey, K. L., Wilcox, M. D., Dingus, J., & Hildebrandt, J. D. (1998). Heterogeneous processing of a G protein gamma subunit at a site critical for protein and membrane interactions. *Biochemistry* 37, 12280-12286.
- Cuervo, A. M. (2004). Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* 14, 70-77.

Dalwadi, H., Wei, B., Schrage, M., Spicher, K., Su, T. T., Birnbaumer, L., Rawlings, D. J., & Braun, J. (2003). B cell developmental requirement for the G alpha i2 gene. *J. Immunol.* 170, 1707-1715.

Davignon, I., Catalina, M. D., Smith, D., Montgomery, J., Swantek, J., Croy, J., Siegelman, M., & Wilkie, T. M. (2000). Normal hematopoiesis and inflammatory responses despite discrete signaling defects in Galpha15 knockout mice. *Mol. Cell Biol.* 20, 797-804.

De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R. L., Wattiaux, R., & Appelmans, S. F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* 60, 604-617.

De Duve, C. & Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol* 28, 435-492.

De Vries L., Fischer, T., Tronchere, H., Brothers, G. M., Strockbine, B., Siderovski, D. P., & Farquhar, M. G. (2000). Activator of G protein signaling 3 is a guanine dissociation inhibitor for Galpha i subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 14364-14369.

De Vries L., Mousli, M., Wurmser, A., & Farquhar, M. G. (1995). GAIP, a protein that specifically interacts with the trimeric G protein G alpha i3, is a member of a protein family with a highly conserved core domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 11916-11920.

Degtjar, V. E., Harhammer, R., & Nürnberg, B. (1997). Receptors couple to L-type calcium channels via distinct Go proteins in rat neuroendocrine cell lines. *J. Physiol* 502 (Pt 2), 321-333.

Denker, S. P., McCaffery, J. M., Palade, G. E., Insel, P. A., & Farquhar, M. G. (1996). Differential distribution of alpha subunits and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on Golgi membranes of the exocrine pancreas. *J. Cell Biol.* 133, 1027-1040.

Dennis, P. B., Jaeschke, A., Saitoh, M., Fowler, B., Kozma, S. C., & Thomas, G. (2001). Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science* 294, 1102-1105.

Dhanasekaran, N., Prasad, M. V., Wadsworth, S. J., Dermott, J. M., & van, R. G. (1994). Protein kinase C-dependent and -independent activation of Na⁺/H⁺ exchanger by G alpha 12 class of G proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 11802-11806.

Dhingra, A., Lyubarsky, A., Jiang, M., Pugh, E. N., Jr., Birnbaumer, L., Sterling, P., & Vardi, N. (2000). The light response of ON bipolar neurons requires G[alpha]o. *J. Neurosci.* 20, 9053-9058.

- Di Pietro, S. M., Falcon-Perez, J. M., Tenza, D., Setty, S. R., Marks, M. S., Raposo, G., & Dell'Angelica, E. C. (2006). BLOC-1 interacts with BLOC-2 and the AP-3 complex to facilitate protein trafficking on endosomes. *Mol. Biol. Cell* 17, 4027-4038.
- Diaz Anel, A. M. & Malhotra, V. (2005). PKC ϵ is required for β 1 γ 2/ β 3 γ 2- and PKD-mediated transport to the cell surface and the organization of the Golgi apparatus. *J. Cell Biol.* 169, 83-91.
- Dizayee, S., Kaestner, S., Kuck, F., Hein, P., Klein, C., Piekorz, R. P., Meszaros, J., Matthes, J., Nurnberg, B., & Herzig, S. (2011). Galphai2 - and Galphai3 -specific regulation of voltage-dependent L-type calcium channels in cardiomyocytes. *PLoS One*. 6, e24979.
- Edinger, A. L. & Thompson, C. B. (2004). Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16, 663-669.
- Ericsson, J. L. E. (1969). Studies on induced cellular autophagy : I. Electron microscopy of cells with in vivo labelled lysosomes. *Experimental Cell Research* 55, 95-106.
- Eskelinen, E. L. (2005). Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* 1, 1-10.
- Exner, T. & Nürnberg, B. (1998). Immuno- and gold staining of a single western blot. *Anal. Biochem.* 260, 108-110.
- Ezaki, J., Kominami, E., & Ueno, T. (2011). Peroxisome degradation in mammals. *IUBMB. Life* 63, 1001-1008.
- Ezan, J., Lasvaux, L., Gezer, A., Novakovic, A., May-Simera, H., Belotti, E., Lhoumeau, A. C., Birnbaumer, L., Beer-Hammer, S., Borg, J. P., Le, B. A., Nurnberg, B., Sans, N., & Montcouquiol, M. (2013). Primary cilium migration depends on G-protein signalling control of subapical cytoskeleton. *Nat. Cell Biol.* 15, 1107-1115.
- Fengsrud, M., Roos, N., Berg, T., Liou, W., Slot, J. W., & Seglen, P. O. (1995). Ultrastructural and immunocytochemical characterization of autophagic vacuoles in isolated hepatocytes: effects of vinblastine and asparagine on vacuole distributions. *Exp. Cell Res.* 221, 504-519.
- Fuchs, T., Saunders-Pullman, R., Masuho, I., Luciano, M. S., Raymond, D., Factor, S., Lang, A. E., Liang, T. W., Trosch, R. M., White, S., Ainehsazan, E., Herve, D., Sharma, N., Ehrlich, M. E., Martemyanov, K. A., Bressman, S. B., & Ozelius, L. J. (2013). Mutations in GNAL cause primary torsion dystonia. *Nat. Genet.* 45, 88-92.
- Fukada, Y., Takao, T., Ohguro, H., Yoshizawa, T., Akino, T., & Shimonishi, Y. (1990). Farnesylated gamma-subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding. *Nature* 346, 658-660.

- Garbers, D. L., Koesling, D., & Schultz, G. (1994). Guanylyl cyclase receptors. *Mol. Biol. Cell* 5, 1-5.
- Garcia-Marcos, M., Ear, J., Farquhar, M. G., & Ghosh, P. (2011). A GDI (AGS3) and a GEF (GIV) regulate autophagy by balancing G protein activity and growth factor signals. *Mol. Biol. Cell* 22, 673-686.
- Garcia-Marcos, M., Ghosh, P., & Farquhar, M. G. (2009). GIV is a nonreceptor GEF for G alpha i with a unique motif that regulates Akt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 3178-3183.
- Gautam, R., Novak, E. K., Tan, J., Wakamatsu, K., Ito, S., & Swank, R. T. (2006). Interaction of Hermansky-Pudlak Syndrome genes in the regulation of lysosome-related organelles. *Traffic* 7, 779-792.
- Gawler, D., Milligan, G., Spiegel, A. M., Unson, C. G., & Houslay, M. D. (1987). Abolition of the expression of inhibitory guanine nucleotide regulatory protein Gi activity in diabetes. *Nature* 327, 229-232.
- Ghosh, P., Beas, A. O., Bornheimer, S. J., Garcia-Marcos, M., Forry, E. P., Johannson, C., Ear, J., Jung, B. H., Cabrera, B., Carethers, J. M., & Farquhar, M. G. (2010). A G{alpha}i-GIV molecular complex binds epidermal growth factor receptor and determines whether cells migrate or proliferate. *Mol. Biol. Cell* 21, 2338-2354.
- Gohla, A., Klement, K., & Nürnberg, B. (2007a). The heterotrimeric G protein G(i3) regulates hepatic autophagy downstream of the insulin receptor. *Autophagy* 3, 393-395.
- Gohla, A., Klement, K., Piekorz, R. P., Pexa, K., vom, D. S., Spicher, K., Dreval, V., Haussinger, D., Birnbaumer, L., & Nürnberg, B. (2007b). An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein Gi3 in the antiautophagic action of insulin in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 3003-3008.
- Greif, G. J., Sodickson, D. L., Bean, B. P., Neer, E. J., & Mende, U. (2000). Altered regulation of potassium and calcium channels by GABA(B) and adenosine receptors in hippocampal neurons from mice lacking Galpha(o). *J. Neurophysiol.* 83, 1010-1018.
- Gu, J. L., Muller, S., Mancino, V., Offermanns, S., & Simon, M. I. (2002). Interaction of G alpha(12) with G alpha(13) and G alpha(q) signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 9352-9357.
- Gudermann, T., Kalkbrenner, F., & Schultz, G. (1996). Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 429-459.
- Gudermann, T., Nürnberg, B., & Schultz, G. (1995). Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. *J. Mol. Med.* 73, 51-63.

- Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K., & Lippincott-Schwartz, J. (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141, 656-667.
- Hamm, H. E. (1998). The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 273, 669-672.
- Harlow, E. & Lane, D. (1999). *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hartmann, J., Blum, R., Kovalchuk, Y., Adelsberger, H., Kuner, R., Durand, G. M., Miyata, M., Kano, M., Offermanns, S., & Konnerth, A. (2004). Distinct roles of $G_{\alpha}(q)$ and $G_{\alpha}11$ for Purkinje cell signaling and motor behavior. *J. Neurosci.* 24, 5119-5130.
- Häussinger, D., Schliess, F., Dombrowski, F., & vom, D. S. (1999). Involvement of p38MAPK in the regulation of proteolysis by liver cell hydration. *Gastroenterology* 116, 921-935.
- Hawkins, P. T., Anderson, K. E., Davidson, K., & Stephens, L. R. (2006). Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 647-662.
- He, J., Gurunathan, S., Iwasaki, A., sh-Shaheed, B., & Kelsall, B. L. (2000). Primary role for G_i protein signaling in the regulation of interleukin 12 production and the induction of T helper cell type 1 responses. *J. Exp. Med.* 191, 1605-1610.
- He, W., Yasumatsu, K., Varadarajan, V., Yamada, A., Lem, J., Ninomiya, Y., Margolskee, R. F., & Damak, S. (2004). Umami taste responses are mediated by α -transducin and α -gustducin. *J. Neurosci.* 24, 7674-7680.
- Hendry, I. A., Kelleher, K. L., Bartlett, S. E., Leck, K. J., Reynolds, A. J., Heydon, K., Mellick, A., Megirian, D., & Matthaei, K. I. (2000). Hypertolerance to morphine in $G(z)$ -deficient mice. *Brain Res.* 870, 10-19.
- Hepler, J. R. & Gilman, A. G. (1992). G proteins. *Trends Biochem. Sci.* 17, 383-387.
- Hermouet, S., de, M. P., Spiegel, A. M., Farquhar, M. G., & Wilson, B. S. (1992). High level expression of transfected G protein α_{i3} subunit is required for plasma membrane targeting and adenylyl cyclase inhibition in NIH 3T3 fibroblasts. *FEBS Lett.* 312, 223-228.
- Hershko, A. & Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-479.
- Ho, M. K. & Wong, Y. H. (2001). $G(z)$ signaling: emerging divergence from $G(i)$ signaling. *Oncogene* 20, 1615-1625.

- Hua, L. J., Jain, S., McMillin, S. M., Cui, Y., Gautam, D., Sakamoto, W., Lu, H., Jou, W., McGuinness, O. P., Gavrilova, O., & Wess, J. (2013). A Novel Experimental Strategy to Assess the Metabolic Effects of Selective Activation of a Gq-Coupled Receptor in Hepatocytes In Vivo. *Endocrinology* 154, 3539-3551.
- Hutchins, M. U., Veenhuis, M., & Klionsky, D. J. (1999). Peroxisome degradation in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on machinery of macroautophagy and the Cvt pathway. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 22), 4079-4087.
- Ishibashi, K., Fujita, N., Kanno, E., Omori, H., Yoshimori, T., Itoh, T., & Fukuda, M. (2011). Atg16L2, a novel isoform of mammalian Atg16L that is not essential for canonical autophagy despite forming an Atg12-5-16L2 complex. *Autophagy* 7, 1500-1513.
- Jadot, M., Colmant, C., Wattiaux-De, C. S., & Wattiaux, R. (1984). Intralysosomal hydrolysis of glycyl-L-phenylalanine 2-naphthylamide. *Biochem. J.* 219, 965-970.
- Jain, M., Lim, C. C., Nagata, K., Davis, V. M., Milstone, D. S., Liao, R., & Mortensen, R. M. (2001). Targeted inactivation of Galpha(i) does not alter cardiac function or beta-adrenergic sensitivity. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 280, H569-H575.
- Jiang, G. & Zhang, B. B. (2003). Glucagon and regulation of glucose metabolism. *Am. J. Physiol Endocrinol. Metab* 284, E671-E678.
- Jiang, M., Gold, M. S., Boulay, G., Spicher, K., Peyton, M., Brabet, P., Srinivasan, Y., Rudolph, U., Ellison, G., & Birnbaumer, L. (1998). Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 3269-3274.
- Jiang, M., Spicher, K., Boulay, G., Martin-Requero, A., Dye, C. A., Rudolph, U., & Birnbaumer, L. (2002). Mouse gene knockout and knockin strategies in application to alpha subunits of Gi/Go family of G proteins. *Methods Enzymol.* 344, 277-298.
- Jones, D. T. & Reed, R. R. (1989). Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science* 244, 790-795.
- Jones, M. B., Siderovski, D. P., & Hooks, S. B. (2004). The G betagamma dimer as a novel source of selectivity in G-protein signaling: GGL-ing at convention. *Mol. Interv.* 4, 200-214.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 19, 5720-5728.
- Kadowaki, M., Karim, M. R., Carpi, A., & Miotto, G. (2006). Nutrient control of macroautophagy in mammalian cells. *Mol. Aspects Med.* 27, 426-443.

- Kadowaki, M., Venerando, R., Miotto, G., & Mortimore, G. E. (1994). De novo autophagic vacuole formation in hepatocytes permeabilized by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin. Inhibition by nonhydrolyzable GTP analogs. *J. Biol. Chem.* 269, 3703-3710.
- Kaplan, J. (1981). Polypeptide-binding membrane receptors: analysis and classification. *Science* 212, 14-20.
- Katada, T. & Ui, M. (1982). Direct modification of the membrane adenylate cyclase system by islet-activating protein due to ADP-ribosylation of a membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79, 3129-3133.
- Kaupp, U. B. & Koch, K. W. (1992). Role of cGMP and Ca²⁺ in vertebrate photoreceptor excitation and adaptation. *Annu. Rev. Physiol* 54, 153-175.
- Kaziro, Y., Itoh, H., Kozasa, T., Nakafuku, M., & Satoh, T. (1991). Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 60, 349-400.
- Kebede, M. A., Alquier, T., Latour, M. G., & Poitout, V. (2009). Lipid receptors and islet function: therapeutic implications? *Diabetes Obes. Metab* 11 Suppl 4, 10-20.
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., Latek, R. R., Guntur, K. V., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., & Sabatini, D. M. (2003). GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Mol. Cell* 11, 895-904.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P., & Guan, K. L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* 10, 935-945.
- Kim, J. & Klionsky, D. J. (2000). Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 303-342.
- Kimple, M. E., Joseph, J. W., Bailey, C. L., Fueger, P. T., Hendry, I. A., Newgard, C. B., & Casey, P. J. (2008). Galphaz negatively regulates insulin secretion and glucose clearance. *J. Biol. Chem.* 283, 4560-4567.
- Kimple, M. E., Moss, J. B., Brar, H. K., Rosa, T. C., Truchan, N. A., Pasker, R. L., Newgard, C. B., & Casey, P. J. (2012). Deletion of GalphaZ protein protects against diet-induced glucose intolerance via expansion of beta-cell mass. *J. Biol. Chem.* 287, 20344-20355.
- Kimple, R. J., Kimple, M. E., Betts, L., Sondek, J., & Siderovski, D. P. (2002). Structural determinants for GoLoco-induced inhibition of nucleotide release by Galpha subunits. *Nature* 416, 878-881.

Kimura, S., Fujita, N., Noda, T., & Yoshimori, T. (2009). Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3. *Methods Enzymol.* 452, 1-12.

Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.* 147, 435-446.

Klionsky, D. J. (2004). Cell biology: regulated self-cannibalism. *Nature* 431, 31-32.

Klionsky, D. J. (2007). Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 931-937.

Klionsky, D. J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D. K., Aliev, G., Askew, D. S., Baba, M., Baehrecke, E. H., Bahr, B. A., Ballabio, A., Bamber, B. A., Bassham, D. C., Bergamini, E., Bi, X., Biard-Piechaczyk, M., Blum, J. S., Bredesen, D. E., Brodsky, J. L., Brumell, J. H., Brunk, U. T., Bursch, W., Camougrand, N., Cebollero, E., Cecconi, F., Chen, Y., Chin, L. S., Choi, A., Chu, C. T., Chung, J., Clarke, P. G., Clark, R. S., Clarke, S. G., Clave, C., Cleveland, J. L., Codogno, P., Colombo, M. I., Coto-Montes, A., Cregg, J. M., Cuervo, A. M., Debnath, J., Demarchi, F., Dennis, P. B., Dennis, P. A., Deretic, V., Devenish, R. J., Di, S. F., Dice, J. F., Difiglia, M., nesh-Kumar, S., Distelhorst, C. W., Djavaheri-Mergny, M., Dorsey, F. C., Droge, W., Dron, M., Dunn, W. A., Jr., Duszenko, M., Eissa, N. T., Elazar, Z., Esclatine, A., Eskelinen, E. L., Fesus, L., Finley, K. D., Fuentes, J. M., Fueyo, J., Fujisaki, K., Galliot, B., Gao, F. B., Gewirtz, D. A., Gibson, S. B., Gohla, A., Goldberg, A. L., Gonzalez, R., Gonzalez-Estevez, C., Gorski, S., Gottlieb, R. A., Haussinger, D., He, Y. W., Heidenreich, K., Hill, J. A., Hoyer-Hansen, M., Hu, X., Huang, W. P., Iwasaki, A., Jaattela, M., Jackson, W. T., Jiang, X., Jin, S., Johansen, T., Jung, J. U., Kadowaki, M., Kang, C., Kelekar, A., Kessel, D. H., Kiel, J. A., Kim, H. P., Kimchi, A., Kinsella, T. J., Kiselyov, K., Kitamoto, K., Knecht, E., Komatsu, M., Kominami, E., Kondo, S., Kovacs, A. L., Kroemer, G., Kuan, C. Y., Kumar, R., Kundu, M., Landry, J., Laporte, M., Le, W., Lei, H. Y., Lenardo, M. J., Levine, B., Lieberman, A., Lim, K. L., Lin, F. C., Liou, W., Liu, L. F., Lopez-Berestein, G., Lopez-Otin, C., Lu, B., Macleod, K. F., Malorni, W., Martinet, W., Matsuoka, K., Mautner, J., Meijer, A. J., Melendez, A., Michels, P., Miotto, G., Mistiaen, W. P., Mizushima, N., Mograbi, B., Monastyrska, I., Moore, M. N., Moreira, P. I., Moriyasu, Y., Motyl, T., Munz, C., Murphy, L. O., Naqvi, N. I., Neufeld, T. P., Nishino, I., Nixon, R. A., Noda, T., Nurnberg, B., Ogawa, M., Oleinick, N. L., Olsen, L. J., Ozpolat, B., Paglin, S., Palmer, G. E., Papassideri, I., Parkes, M., Perlmutter, D. H., Perry, G., Piacentini, M., Pinkas-Kramarski, R., Prescott, M., Proikas-Cezanne, T., Raben, N., Rami, A., Reggiori, F., Rohrer, B., Rubinsztein, D. C., Ryan, K. M., Sadoshima, J., Sakagami, H., Sakai, Y., Sandri, M., Sasakawa, C., Sass, M., Schneider, C., Seglen, P. O., Selverstov, O., Settleman, J., Shacka, J. J., Shapiro, I. M., Sibirny, A., Silva-Zacarin, E. C., Simon, H. U., Simone, C., Simonsen, A., Smith, M. A., Spanel-Borowski, K., Srinivas, V., Steeves, M., Stenmark, H., Stromhaug, P. E., Subauste, C. S., Sugimoto, S., Sulzer, D., Suzuki, T., Swanson, M. S., Tabas, I., Takeshita, F., Talbot, N. J., Talloczy, Z., Tanaka, K., Tanaka, K., Tanida, I., Taylor, G. S., Taylor, J. P., Terman, A., Tettamanti, G., Thompson, C. B., Thumm, M., Tolkovsky, A. M., Tooze, S. A., Truant, R., Tumanovska, L. V., Uchiyama, Y., Ueno, T., Uzcategui, N. L., van, d. K., I, Vaquero, E. C., Vellai, T., Vogel, M. W., Wang, H. G.,

Webster, P., Wiley, J. W., Xi, Z., Xiao, G., Yahalom, J., Yang, J. M., Yap, G., Yin, X. M., Yoshimori, T., Yu, L., Yue, Z., Yuzaki, M., Zabirnyk, O., Zheng, X., Zhu, X., & Deter, R. L. (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy*. 4, 151-175.

Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A., Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., & Ohsumi, Y. (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* 5, 539-545.

Kornmann, B., Currie, E., Collins, S. R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J. S., & Walter, P. (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* 325, 477-481.

Kovacs, A. L., Reith, A., & Seglen, P. O. (1982). Accumulation of autophagosomes after inhibition of hepatocytic protein degradation by vinblastine, leupeptin or a lysosomotropic amine. *Exp. Cell Res.* 137, 191-201.

Kozasa, T., Hajicek, N., Chow, C. R., & Suzuki, N. (2011). Signalling mechanisms of RhoGTPase regulation by the heterotrimeric G proteins G12 and G13. *J. Biochem.* 150, 357-369.

Kozasa, T., Hepler, J. R., Smrcka, A. V., Simon, M. I., Rhee, S. G., Sternweis, P. C., & Gilman, A. G. (1993). Purification and characterization of recombinant G16 alpha from Sf9 cells: activation of purified phospholipase C isozymes by G-protein alpha subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 9176-9180.

Krauss, M., Korr, D., Herrmann, A., & Hucho, F. (2000). Binding properties of agonists and antagonists to distinct allosteric states of the nicotinic acetylcholine receptor are incompatible with a concerted model. *J. Biol. Chem.* 275, 30196-30201.

Kreuzer, J., Nürnberg, B., & Krieger-Brauer, H. I. (2004). Ligand-dependent autophosphorylation of the insulin receptor is positively regulated by Gi-proteins. *Biochem. J.* 380, 831-836.

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhi, T., & Mizushima, N. (2004). The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 432, 1032-1036.

Kuma, A. & Mizushima, N. (2010). Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 683-690.

Lambright, D. G., Sondek, J., Böhm, A., Skiba, N. P., Hamm, H. E., & Sigler, P. B. (1996). The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379, 311-319.

- Lapierre, L. R., Gelino, S., Melendez, A., & Hansen, M. (2011). Autophagy and lipid metabolism coordinately modulate life span in germline-less *C. elegans*. *Curr. Biol.* 21, 1507-1514.
- Lavallard, V. J., Meijer, A. J., Codogno, P., & Gual, P. (2012). Autophagy, signaling and obesity. *Pharmacol. Res.* 66, 513-525.
- Le-Niculescu, H., Niesman, I., Fischer, T., DeVries, L., & Farquhar, M. G. (2005). Identification and characterization of GIV, a novel Galpha i/s-interacting protein found on COPI, endoplasmic reticulum-Golgi transport vesicles. *J. Biol. Chem.* 280, 22012-22020.
- Levine, B. (2005). Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 120, 159-162.
- Levine, B. & Klionsky, D. J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* 6, 463-477.
- Levine, B. & Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict? *J. Clin. Invest* 115, 2679-2688.
- Li, X., Staszewski, L., Xu, H., Durick, K., Zoller, M., & Adler, E. (2002). Human receptors for sweet and umami taste. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 4692-4696.
- Liang, X. H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., & Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672-676.
- Logothetis, D. E., Kurachi, Y., Galper, J., Neer, E. J., & Clapham, D. E. (1987). The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 325, 321-326.
- Lou, X., McQuistan, T., Orlando, R. A., & Farquhar, M. G. (2002). GAIP, GIPC and Galphai3 are concentrated in endocytic compartments of proximal tubule cells: putative role in regulating megalin's function. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13, 918-927.
- Luo, A. H., Cannon, E. H., Wekesa, K. S., Lyman, R. F., Vandenberg, J. G., & Anholt, R. R. (2002). Impaired olfactory behavior in mice deficient in the alpha subunit of G(o). *Brain Res.* 941, 62-71.
- Lynch-Day, M. A. & Klionsky, D. J. (2010). The Cvt pathway as a model for selective autophagy. *FEBS Lett.* 584, 1359-1366.
- Madeo, F., Tavernarakis, N., & Kroemer, G. (2010). Can autophagy promote longevity? *Nat. Cell Biol.* 12, 842-846.

- Maier, O., Ehmsen, E., & Westermann, P. (1995). Trimeric G protein alpha subunits of the Gs and Gi families localized at the Golgi membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 135-143.
- Maier, U., Babich, A., Macrez, N., Leopoldt, D., Gierschik, P., Illenberger, D., & Nürnberg, B. (2000). Gbeta 5gamma 2 is a highly selective activator of phospholipid-dependent enzymes. *J. Biol. Chem.* 275, 13746-13754.
- Marrari, Y., Crouthamel, M., Irannejad, R., & Wedegaertner, P. B. (2007). Assembly and trafficking of heterotrimeric G proteins. *Biochemistry* 46, 7665-7677.
- Meijer, A. J. & Codogno, P. (2006). Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol. Aspects Med.* 27, 411-425.
- Meijer, A. J. & Codogno, P. (2004). Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2445-2462.
- Meijer, W. H., van, d. K., I, Veenhuis, M., & Kiel, J. A. (2007). ATG genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective Cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy* 3, 106-116.
- Miura, M., Watanabe, M., Offermanns, S., Simon, M. I., & Kano, M. (2002). Group I metabotropic glutamate receptor signaling via Galpha q/Galpha 11 secures the induction of long-term potentiation in the hippocampal area CA1. *J. Neurosci.* 22, 8379-8390.
- Mizushima, N. (2004). Methods for monitoring autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2491-2502.
- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* 116, 1679-1688.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhisa, T., Ohsumi, Y., & Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell Biol.* 152, 657-668.
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 107-132.
- Moffett, S., Brown, D. A., & Linder, M. E. (2000). Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. *J. Biol. Chem.* 275, 2191-2198.
- Monastyrska, I. & Klionsky, D. J. (2006). Autophagy in organelle homeostasis: peroxisome turnover. *Mol. Aspects Med.* 27, 483-494.

- Morales, J., Fishburn, C. S., Wilson, P. T., & Bourne, H. R. (1998). Plasma membrane localization of G α z requires two signals. *Mol. Biol. Cell* 9, 1-14.
- Morselli, E., Galluzzi, L., Kepp, O., Criollo, A., Maiuri, M. C., Tavernarakis, N., Madeo, F., & Kroemer, G. (2009). Autophagy mediates pharmacological lifespan extension by spermidine and resveratrol. *Aging (Albany, NY)* 1, 961-970.
- Morselli, E., Marino, G., Bennetzen, M. V., Eisenberg, T., Megalou, E., Schroeder, S., Cabrera, S., Benit, P., Rustin, P., Criollo, A., Kepp, O., Galluzzi, L., Shen, S., Malik, S. A., Maiuri, M. C., Horio, Y., Lopez-Otin, C., Andersen, J. S., Tavernarakis, N., Madeo, F., & Kroemer, G. (2011). Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *J. Cell Biol.* 192, 615-629.
- Mortimore, G. E. & Schworer, C. M. (1977). Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature* 270, 174-176.
- Motley, A. M., Nuttall, J. M., & Hettima, E. H. (2012). Pex3-anchored Atg36 tags peroxisomes for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 31, 2852-2868.
- Moxham, C. M. & Malbon, C. C. (1996). Insulin action impaired by deficiency of the G-protein subunit G α 2. *Nature* 379, 840-844.
- Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., Hamada, S., & Yoshimori, T. (2004). Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* 306, 1037-1040.
- Nakatogawa, H., Ichimura, Y., & Ohsumi, Y. (2007). Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion. *Cell* 130, 165-178.
- Natochin, M., Gasimov, K. G., & Artemyev, N. O. (2002). A GPR-protein interaction surface of Gi(α): implications for the mechanism of GDP-release inhibition. *Biochemistry* 41, 258-265.
- Neer, E. J. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80, 249-257.
- Neer, E. J., Schmidt, C. J., Nambudripad, R., & Smith, T. F. (1994). The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature* 371, 297-300.
- Nesbit, M. A., Hannan, F. M., Howles, S. A., Babinsky, V. N., Head, R. A., Cranston, T., Rust, N., Hobbs, M. R., Heath, H., III, & Thakker, R. V. (2013). Mutations affecting G-protein subunit α 11 in hypercalcemia and hypocalcemia. *N. Engl. J. Med.* 368, 2476-2486.

Noda, T., Matsuura, A., Wada, Y., & Ohsumi, Y. (1995). Novel system for monitoring autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210, 126-132.

Novotny, J. & Svoboda, P. (1998). The long (Gs(alpha)-L) and short (Gs(alpha)-S) variants of the stimulatory guanine nucleotide-binding protein. Do they behave in an identical way? *J. Mol. Endocrinol.* 20, 163-173.

Nürnberg, B. & Ahnert-Hilger, G. (1996). Potential roles of heterotrimeric G proteins of the endomembrane system. *FEBS Lett.* 389, 61-65.

Nürnberg, B., Gudermann, T., & Schultz, G. (1995). Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. *J. Mol. Med.* 73, 123-132.

Nürnberg, B., Spicher, K., Harhammer, R., Bosserhoff, A., Frank, R., Hilz, H., & Schultz, G. (1994). Purification of a novel G-protein alpha 0-subtype from mammalian brain. *Biochem. J.* 300 (Pt 2), 387-394.

Offermanns, S. (2006). Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ. Res.* 99, 1293-1304.

Offermanns, S., Mancino, V., Revel, J. P., & Simon, M. I. (1997a). Vascular system defects and impaired cell chemokinesis as a result of Galpha13 deficiency. *Science* 275, 533-536.

Offermanns, S., Toombs, C. F., Hu, Y. H., & Simon, M. I. (1997b). Defective platelet activation in G alpha(q)-deficient mice. *Nature* 389, 183-186.

Offermanns, S., Zhao, L. P., Gohla, A., Sarosi, I., Simon, M. I., & Wilkie, T. M. (1998). Embryonic cardiomyocyte hypoplasia and craniofacial defects in G alpha q/G alpha 11-mutant mice. *EMBO J.* 17, 4304-4312.

Ogier-Denis, E., Couvineau, A., Maoret, J. J., Houri, J. J., Bauvy, C., De, S. D., Isidoro, C., Laburthe, M., & Codogno, P. (1995). A heterotrimeric Gi3-protein controls autophagic sequestration in the human colon cancer cell line HT-29. *J. Biol. Chem.* 270, 13-16.

Ogier-Denis, E., Houri, J. J., Bauvy, C., & Codogno, P. (1996). Guanine nucleotide exchange on heterotrimeric Gi3 protein controls autophagic sequestration in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* 271, 28593-28600.

Ogier-Denis, E., Pattingre, S., El, B. J., & Codogno, P. (2000). Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity and autophagy in human colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* 275, 39090-39095.

- Ohman, L., Franzen, L., Rudolph, U., Harriman, G. R., & Hultgren, H. E. (2000). Immune activation in the intestinal mucosa before the onset of colitis in Galphai2-deficient mice. *Scand. J. Immunol.* 52, 80-90.
- Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 211-216.
- Oka, Y., Saraiva, L. R., Kwan, Y. Y., & Korsching, S. I. (2009). The fifth class of Galpha proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 1484-1489.
- Oldham, W. M. & Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 60-71.
- Pagliara, P., Carla, E. C., Caforio, S., Chionna, A., Massa, S., Abbro, L., & Dini, L. (2003). Kupffer cells promote lead nitrate-induced hepatocyte apoptosis via oxidative stress. *Comp Hepatol.* 2, 8.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C. A., Motoshima, H., Fox, B. A., Le, T., I, Teller, D. C., Okada, T., Stenkamp, R. E., Yamamoto, M., & Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.
- Pattingre, S., De, V. L., Bauvy, C., Chantret, I., Cluzeaud, F., Ogier-Denis, E., Vandewalle, A., & Codogno, P. (2003). The G-protein regulator AGS3 controls an early event during macroautophagy in human intestinal HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* 278, 20995-21002.
- Pawley, J. B. (2006). *Handbook of biological confocal microscopy*, 3 ed. New York: Springer Science and Business Media – LLC.
- Peitzsch, R. M. & McLaughlin, S. (1993). Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* 32, 10436-10443.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Bauvy, C., Cluzeaud, F., Vandewalle, A., & Codogno, P. (1999). Subcellular localization of the Galphai3 protein and G alpha interacting protein, two proteins involved in the control of macroautophagy in human colon cancer HT-29 cells. *Biochem. J.* 337 (Pt 2), 289-295.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaart, E. F., Meijer, A. J., & Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* 275, 992-998.
- Petiot, A., Pattingre, S., Arico, S., Meley, D., & Codogno, P. (2002). Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* 27, 431-441.

Pfeuffer, T. (1977). GTP-binding proteins in membranes and the control of adenylate cyclase activity. *J. Biol. Chem.* 252, 7224-7234.

Pfeuffer, T. & Helmreich, E. J. (1988). Structural and functional relationships of guanosine triphosphate binding proteins. *Curr. Top. Cell Regul.* 29, 129-216.

Plummer, N. W., Spicher, K., Malphurs, J., Akiyama, H., Abramowitz, J., Nurnberg, B., & Birnbaumer, L. (2012). Development of the mammalian axial skeleton requires signaling through the Galphai subfamily of heterotrimeric G proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 109, 21366-21371.

Porsolt, R. D., Bertin, A., & Jalfre, M. (1977a). Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 229, 327-336.

Porsolt, R. D., Le, P. M., & Jalfre, M. (1977b). Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature* 266, 730-732.

Prasad, M. V., Dermott, J. M., Heasley, L. E., Johnson, G. L., & Dhanasekaran, N. (1995). Activation of Jun kinase/stress-activated protein kinase by GTPase-deficient mutants of G alpha 12 and G alpha 13. *J. Biol. Chem.* 270, 18655-18659.

Radoshevich, L., Murrow, L., Chen, N., Fernandez, E., Roy, S., Fung, C., & Debnath, J. (2010). ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis and cell death. *Cell* 142, 590-600.

Rasmussen, S. G., Choi, H. J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F., Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450, 383-387.

Rasmussen, S. G., DeVree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skinotitis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K., & Kobilka, B. K. (2011). Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature* 477, 549-555.

Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., & Rubinsztein, D. C. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* 12, 747-757.

Ray, K., Kunsch, C., Bonner, L. M., & Robishaw, J. D. (1995). Isolation of cDNA clones encoding eight different human G protein gamma subunits, including three novel forms designated the gamma 4, gamma 10, and gamma 11 subunits. *J. Biol. Chem.* 270, 21765-21771.

Reed, D. R., Lawler, M. P., & Tordoff, M. G. (2008). Reduced body weight is a common effect of gene knockout in mice. *BMC. Genet.* 9, 4.

Reggiori, F. & Klionsky, D. J. (2005). Autophagosomes: biogenesis from scratch? *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 415-422.

Reggiori, F., Wang, C. W., Nair, U., Shintani, T., Abeliovich, H., & Klionsky, D. J. (2004). Early stages of the secretory pathway, but not endosomes, are required for Cvt vesicle and autophagosome assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 15, 2189-2204.

Regner, K. R., Nozu, K., Lanier, S. M., Blumer, J. B., Avner, E. D., Sweeney, W. E., Jr., & Park, F. (2011). Loss of activator of G-protein signaling 3 impairs renal tubular regeneration following acute kidney injury in rodents. *FASEB J.* 25, 1844-1855.

Rhee, S. G. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* 70, 281-312.

Ribeiro-Neto, F. A. & Rodbell, M. (1989). Pertussis toxin induces structural changes in G alpha proteins independently of ADP-ribosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 2577-2581.

Richter, W., Day, P., Agrawal, R., Bruss, M. D., Granier, S., Wang, Y. L., Rasmussen, S. G., Horner, K., Wang, P., Lei, T., Patterson, A. J., Kobilka, B., & Conti, M. (2008). Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *EMBO J.* 27, 384-393.

Rodgers, B. D., Levine, M. A., Bernier, M., & Montrose-Rafizadeh, C. (2001). Insulin regulation of a novel WD-40 repeat protein in adipocytes. *J. Endocrinol.* 168, 325-332.

Rubinsztein, D. C., Gestwicki, J. E., Murphy, L. O., & Klionsky, D. J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 304-312.

Rubinsztein, D. C., Marino, G., & Kroemer, G. (2011). Autophagy and aging. *Cell* 146, 682-695.

Rudolph, U., Brabet, P., Hasty, P., Bradley, A., & Birnbaumer, L. (1993). Disruption of the G(i2) alpha locus in embryonic stem cells and mice: a modified hit and run strategy with detection by a PCR dependent on gap repair. *Transgenic Res.* 2, 345-355.

Rudolph, U., Finegold, M. J., Rich, S. S., Harriman, G. R., Srinivasan, Y., Brabet, P., Boulay, G., Bradley, A., & Birnbaumer, L. (1995). Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G alpha i2-deficient mice. *Nat. Genet.* 10, 143-150.

Rudolph, U., Koesling, D., Hinsch, K. D., Seifert, R., Bigalke, M., Schultz, G., & Rosenthal, W. (1989). G-protein alpha-subunits in cytosolic and membranous fractions of human neutrophils. *Mol. Cell Endocrinol.* 63, 143-153.

- Rudolph, U., Spicher, K., & Birnbaumer, L. (1996). Adenylyl cyclase inhibition and altered G protein subunit expression and ADP-ribosylation patterns in tissues and cells from Gi2 alpha-/-mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 3209-3214.
- Ruiz, C. J., Wray, K., Delay, E., Margolskee, R. F., & Kinnamon, S. C. (2003). Behavioral evidence for a role of alpha-gustducin in glutamate taste. *Chem. Senses* 28, 573-579.
- Saltiel, A. R. & Kahn, C. R. (2001). Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414, 799-806.
- Sarbassov, D. D., Ali, S. M., & Sabatini, D. M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 596-603.
- Scherz-Shouval, R. & Elazar, Z. (2007). ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol.* 17, 422-427.
- Schlessinger, J. (2000). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211-225.
- Schliess, F. & Häussinger, D. (2003). Cell volume and insulin signaling. *Int. Rev. Cytol.* 225, 187-228.
- Schmid, D., Dengjel, J., Schoor, O., Stevanovic, S., & Munz, C. (2006). Autophagy in innate and adaptive immunity against intracellular pathogens. *J. Mol. Med.* 84, 194-202.
- Schmid, D. & Munz, C. (2007). Innate and adaptive immunity through autophagy. *Immunity* 27, 11-21.
- Schwindinger, W. F. & Robishaw, J. D. (2001). Heterotrimeric G-protein betagamma-dimers in growth and differentiation. *Oncogene* 20, 1653-1660.
- Scott, S. V., Guan, J., Hutchins, M. U., Kim, J., & Klionsky, D. J. (2001). Cvt19 is a receptor for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *Mol. Cell* 7, 1131-1141.
- Seglen, P. O. (1976). Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol.* 13, 29-83.
- Seglen, P. O. & Bohley, P. (1992). Autophagy and other vacuolar protein degradation mechanisms. *Experientia* 48, 158-172.
- Seglen, P. O. & Brinchmann, M. F. (2010). Purification of autophagosomes from rat hepatocytes. *Autophagy* 6.
- Seifert, R. & Wenzel-Seifert, K. (2002). Constitutive activity of G-protein-coupled receptors: cause of disease and common property of wild-type receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 366, 381-416.

- Shibata, M., Yoshimura, K., Furuya, N., Koike, M., Ueno, T., Komatsu, M., Arai, H., Tanaka, K., Kominami, E., & Uchiyama, Y. (2009). The MAP1-LC3 conjugation system is involved in lipid droplet formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 382, 419-423.
- Shintani, T. & Klionsky, D. J. (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306, 990-995.
- Siderovski, D. P. & Willard, F. S. (2005). The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int. J. Biol. Sci.* 1, 51-66.
- Simon, M. I., Strathmann, M. P., & Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252, 802-808.
- Singh, R., Kaushik, S., Wang, Y., Xiang, Y., Novak, I., Komatsu, M., Tanaka, K., Cuervo, A. M., & Czaja, M. J. (2009). Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature* 458, 1131-1135.
- Sivaraj, K. K., Takefuji, M., Schmidt, I., Adams, R. H., Offermanns, S., & Wettschureck, N. (2013). G13 controls angiogenesis through regulation of VEGFR-2 expression. *Dev. Cell* 25, 427-434.
- Skokowa, J., Ali, S. R., Felda, O., Kumar, V., Konrad, S., Shushakova, N., Schmidt, R. E., Piekorz, R. P., Nurnberg, B., Spicher, K., Birnbaumer, L., Zwirner, J., Claassens, J. W., Verbeek, J. S., van, R. N., Kohl, J., & Gessner, J. E. (2005). Macrophages induce the inflammatory response in the pulmonary Arthus reaction through G alpha i2 activation that controls C5aR and Fc receptor cooperation. *J. Immunol.* 174, 3041-3050.
- Slessareva, J. E., Routt, S. M., Temple, B., Bankaitis, V. A., & Dohlman, H. G. (2006). Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase Vps34 by a G protein alpha subunit at the endosome. *Cell* 126, 191-203.
- Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K., & Neer, E. J. (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* 24, 181-185.
- Smrcka, A. V., Hepler, J. R., Brown, K. O., & Sternweis, P. C. (1991). Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science* 251, 804-807.
- Snow, B. E., Krumins, A. M., Brothers, G. M., Lee, S. F., Wall, M. A., Chung, S., Mangion, J., Arya, S., Gilman, A. G., & Siderovski, D. P. (1998). A G protein gamma subunit-like domain shared between RGS11 and other RGS proteins specifies binding to Gbeta5 subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 13307-13312.
- Sondek, J., Bohm, A., Lambright, D. G., Hamm, H. E., & Sigler, P. B. (1996). Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* 379, 369-374.

- Song, X., Zheng, X., Malbon, C. C., & Wang, H. (2001). G α 12 enhances in vivo activation of and insulin signaling to GLUT4. *J. Biol. Chem.* 276, 34651-34658.
- Songyang, Z. & Cantley, L. C. (1995). Recognition and specificity in protein tyrosine kinase-mediated signalling. *Trends Biochem. Sci.* 20, 470-475.
- Spicher, K., Kalkbrenner, F., Zobel, A., Harhammer, R., Nürnberg, B., Soling, A., & Schultz, G. (1994). G12 and G13 α -subunits are immunochemically detectable in most membranes of various mammalian cells and tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198, 906-914.
- Sprang, S. R. (1997). G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 639-678.
- Stephan, J. S., Yeh, Y. Y., Ramachandran, V., Deminoff, S. J., & Herman, P. K. (2009). The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106, 17049-17054.
- Stow, J. L. & de Almeida, J. B. (1993). Distribution and role of heterotrimeric G proteins in the secretory pathway of polarized epithelial cells. *J. Cell Sci. Suppl* 17, 33-39.
- Strathmann, M. P. & Simon, M. I. (1991). G α 12 and G α 13 subunits define a fourth class of G protein α subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 5582-5586.
- Streuli, M. (1996). Protein tyrosine phosphatases in signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 182-188.
- Stromhaug, P. E., Berg, T. O., Fengsrud, M., & Seglen, P. O. (1998). Purification and characterization of autophagosomes from rat hepatocytes. *Biochem. J.* 335 (Pt 2), 217-224.
- Sunahara, R. K., Dessauer, C. W., & Gilman, A. G. (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 36, 461-480.
- Suzuki, N., Nakamura, S., Mano, H., & Kozasa, T. (2003). G α 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 733-738.
- Takeda, S., Kadowaki, S., Haga, T., Takaesu, H., & Mitaku, S. (2002). Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett.* 520, 97-101.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., & Ohsumi, Y. (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* 119, 301-311.

- Talukdar, S., Olefsky, J. M., & Osborn, O. (2011). Targeting GPR120 and other fatty acid-sensing GPCRs ameliorates insulin resistance and inflammatory diseases. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 543-550.
- Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E. L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P. M., Blanz, J., von, F. K., & Saftig, P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* 406, 902-906.
- Tang, G., Wang, Y., Park, S., Bajpayee, N. S., Vi, D., Nagaoka, Y., Birnbaumer, L., & Jiang, M. (2012). Go2 G protein mediates galanin inhibitory effects on insulin release from pancreatic beta cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 109, 2636-2641.
- Tanida, I., Ueno, T., & Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36, 2503-2518.
- Taniguchi, T. (1995). Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268, 251-255.
- ten Dijke, P., Miyazono, K., & Heldin, C. H. (1996). Signaling via hetero-oligomeric complexes of type I and type II serine/threonine kinase receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 139-145.
- Tian, Y., Li, Z., Hu, W., Ren, H., Tian, E., Zhao, Y., Lu, Q., Huang, X., Yang, P., Li, X., Wang, X., Kovacs, A. L., Yu, L., & Zhang, H. (2010). *C. elegans* screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms. *Cell* 141, 1042-1055.
- Tizzano, M., Gulbransen, B. D., Vandenbeuch, A., Clapp, T. R., Herman, J. P., Sibhatu, H. M., Churchill, M. E., Silver, W. L., Kinnamon, S. C., & Finger, T. E. (2010). Nasal chemosensory cells use bitter taste signaling to detect irritants and bacterial signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 107, 3210-3215.
- Tooze, S. A. & Yoshimori, T. (2010). The origin of the autophagosomal membrane. *Nat. Cell Biol.* 12, 831-835.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76, 4350-4354.
- Tsou, R. C. & Bence, K. K. (2012). Central regulation of metabolism by protein tyrosine phosphatases. *Front Neurosci.* 6, 192.
- Tsukada, M. & Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333, 169-174.
- Ueno, T., Muno, D., & Kominami, E. (1991). Membrane markers of endoplasmic reticulum preserved in autophagic vacuolar membranes isolated from leupeptin-administered rat liver. *J. Biol. Chem.* 266, 18995-18999.

Unwin, N. (1993). Neurotransmitter action: opening of ligand-gated ion channels. *Cell* 72 Suppl, 31-41.

Valenti, G., Procino, G., Liebenhoff, U., Frigeri, A., Benedetti, P. A., hner-Hilger, G., Nürnberg, B., Svelto, M., & Rosenthal, W. (1998). A heterotrimeric G protein of the Gi family is required for cAMP-triggered trafficking of aquaporin 2 in kidney epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 273, 22627-22634.

van 't Klooster, G. A., Woutersen-van Nijnanten, F. M., Blaauboer, B. J., Noordhoek, J., & van Miert, A. S. (1994). Applicability of cultured hepatocytes derived from goat, sheep and cattle in comparative drug metabolism studies. *Xenobiotica* 24, 417-428.

Van Dyke, R. W. (2004). Heterotrimeric G protein subunits are located on rat liver endosomes. *BMC. Physiol* 4, 1.

Vanderbeld, B. & Kelly, G. M. (2000). New thoughts on the role of the beta-gamma subunit in G-protein signal transduction. *Biochem. Cell Biol.* 78, 537-550.

Vassilatis, D. K., Hohmann, J. G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J. E., Mortrud, M. T., Brown, A., Rodriguez, S. S., Weller, J. R., Wright, A. C., Bergmann, J. E., & Gaitanaris, G. A. (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 4903-4908.

Vezina, C., Kudelski, A., & Sehgal, S. N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot. (Tokyo)* 28, 721-726.

Vicencio, J. M., Galluzzi, L., Tajeddine, N., Ortiz, C., Criollo, A., Tasdemir, E., Morselli, E., Ben, Y. A., Maiuri, M. C., Lavandro, S., & Kroemer, G. (2008). Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology* 54, 92-99.

Wadhawan, S., Dickins, B., & Nekrutenko, A. (2008). Wheels within wheels: clues to the evolution of the Gnas and Gnal loci. *Mol. Biol. Evol.* 25, 2745-2757.

Wang, Y., Park, S., Bajpayee, N. S., Nagaoka, Y., Boulay, G., Birnbaumer, L., & Jiang, M. (2011). Augmented glucose-induced insulin release in mice lacking G(o2), but not G(o1) or G(i) proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 108, 1693-1698.

Warne, T., Serrano-Vega, M. J., Baker, J. G., Moukhametzianov, R., Edwards, P. C., Henderson, R., Leslie, A. G., Tate, C. G., & Schertler, G. F. (2008). Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 454, 486-491.

Wasmeier, C., Hume, A. N., Bolasco, G., & Seabra, M. C. (2008). Melanosomes at a glance. *J. Cell Sci.* 121, 3995-3999.

- Weinstein, L. S., Xie, T., Zhang, Q. H., & Chen, M. (2007). Studies of the regulation and function of the Gs alpha gene Gnas using gene targeting technology. *Pharmacol. Ther.* 115, 271-291.
- Wells, C., Jiang, X., Gutowski, S., & Sternweis, P. C. (2002). Functional characterization of p115 RhoGEF. *Methods Enzymol.* 345, 371-382.
- Wess, J. (1997). G-protein-coupled receptors: molecular mechanisms involved in receptor activation and selectivity of G-protein recognition. *FASEB J.* 11, 346-354.
- Wettschureck, N., Lee, E., Libutti, S. K., Offermanns, S., Robey, P. G., & Spiegel, A. M. (2007). Parathyroid-specific double knockout of Gq and G11 alpha-subunits leads to a phenotype resembling germline knockout of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor. *Mol. Endocrinol.* 21, 274-280.
- Wettschureck, N. & Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev.* 85, 1159-1204.
- Wiege, K., Ali, S. R., Gewecke, B., Novakovic, A., Konrad, F. M., Pexa, K., Beer-Hammer, S., Reutershan, J., Piekorz, R. P., Schmidt, R. E., Nurnberg, B., & Gessner, J. E. (2013). Galphai2 is the essential Galphai protein in immune complex-induced lung disease. *J. Immunol.* 190, 324-333.
- Wiege, K., Le, D. D., Syed, S. N., Ali, S. R., Novakovic, A., Beer-Hammer, S., Piekorz, R. P., Schmidt, R. E., Nurnberg, B., & Gessner, J. E. (2012). Defective macrophage migration in Galphai2- but not Galphai3-deficient mice. *J. Immunol.* 189, 980-987.
- Wilkie, T. M., Gilbert, D. J., Olsen, A. S., Chen, X. N., Amatruda, T. T., Korenberg, J. R., Trask, B. J., de, J. P., Reed, R. R., Simon, M. I., & . (1992). Evolution of the mammalian G protein alpha subunit multigene family. *Nat. Genet.* 1, 85-91.
- Williams, G. M. & Gunn, J. M. (1974). Long-term cell culture of adult rat liver epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 89, 139-142.
- Wu, J. Y., Jin, Y., Edwards, R. A., Zhang, Y., Finegold, M. J., & Wu, M. X. (2005). Impaired TGF-beta responses in peripheral T cells of G alpha i2-/- mice. *J. Immunol.* 174, 6122-6128.
- Wullschleger, S., Loewith, R., & Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484.
- Wurmser, A. E. & Emr, S. D. (2002). Novel PtdIns(3)P-binding protein Etf1 functions as an effector of the Vps34 PtdIns 3-kinase in autophagy. *J. Cell Biol.* 158, 761-772.
- Xie, Z. & Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell Biol.* 9, 1102-1109.

- Yang, J., Wu, J., Jiang, H., Mortensen, R., Austin, S., Manning, D. R., Woulfe, D., & Brass, L. F. (2002). Signaling through Gi family members in platelets. Redundancy and specificity in the regulation of adenylyl cyclase and other effectors. *J. Biol. Chem.* 277, 46035-46042.
- Yang, J., Wu, J., Kowalska, M. A., Dalvi, A., Prevost, N., O'Brien, P. J., Manning, D., Poncz, M., Lucki, I., Blendy, J. A., & Brass, L. F. (2000). Loss of signaling through the G protein, Gz, results in abnormal platelet activation and altered responses to psychoactive drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 9984-9989.
- Yla-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., & Eskelinen, E. L. (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 5, 1180-1185.
- Yorimitsu, T. & Klionsky, D. J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death. Differ.* 12 Suppl 2, 1542-1552.
- Young, A., Jiang, M., Wang, Y., Ahmedli, N. B., Ramirez, J., Reese, B. E., Birnbaumer, L., & Farber, D. B. (2011). Specific interaction of Galphai3 with the Oa1 G-protein coupled receptor controls the size and density of melanosomes in retinal pigment epithelium. *PLoS. One.* 6, e24376.
- Young, A., Powelson, E. B., Whitney, I. E., Raven, M. A., Nusinowitz, S., Jiang, M., Birnbaumer, L., Reese, B. E., & Farber, D. B. (2008). Involvement of OA1, an intracellular GPCR, and G alpha i3, its binding protein, in melanosomal biogenesis and optic pathway formation. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 3245-3252.
- Yu, S., Yu, D., Lee, E., Eckhaus, M., Lee, R., Corria, Z., Accili, D., Westphal, H., & Weinstein, L. S. (1998). Variable and tissue-specific hormone resistance in heterotrimeric Gs protein alpha-subunit (Galpha) knockout mice is due to tissue-specific imprinting of the galpha gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 8715-8720.
- Yuan, W., Stromhaug, P. E., & Dunn, W. A., Jr. (1999). Glucose-induced autophagy of peroxisomes in *Pichia pastoris* requires a unique E1-like protein. *Mol. Biol. Cell* 10, 1353-1366.
- Zerangue, N. & Jan, L. Y. (1998). G-protein signaling: fine-tuning signaling kinetics. *Curr. Biol.* 8, R313-R316.
- Zhang, Y., Finegold, M. J., Jin, Y., & Wu, M. X. (2005). Accelerated transition from the double-positive to single-positive thymocytes in G alpha i2-deficient mice. *Int. Immunol.* 17, 233-243.
- Zhong, M., Clarke, S., Vo, B. T., & Khan, S. A. (2012). The essential role of Gialpha2 in prostate cancer cell migration. *Mol. Cancer Res.* 10, 1380-1388.

9 ANHANG

9.1 Analyse der Beteiligung von $G_{\alpha i}$ -Proteinen in der Autophagie mittels *In-situ*-Leberperfusion

Die Methode der *in-situ*-Leberperfusion zur Analyse der autophagischen Aktivität beruht auf einer *pulse-chase*-Markierung langlebiger Proteine und der anschließenden Detektion ihrer peptidischen Degradationsprodukte. Diese Untersuchungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Häussinger in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf durchgeführt und durch das Regierungspräsidium Düsseldorf genehmigt. Die *in-situ*-Leberperfusion wurde an Lebern von 8 – 12 Wochen alten männlichen Mäusen mit einem Körpergewicht von 20 – 25 g durchgeführt, wie dies für Ratten beschrieben wurde (Häussinger *et al.*, 1999). Den Mäusen wurde 16 Stunden vor Versuchsdurchführung intraperitoneal 5 μCi ^3H -Leucin injiziert. Diese radioaktiv markierte Aminosäure kann in gleichem Ausmaß wie nicht markiertes Leucin zur Proteinbiosynthese verwendet werden. Die hepatische autophagische Proteolyse wurde durch Perfusion der Leber mit Nährstoff-armen Puffern induziert (Mortimore & Schworer, 1977). Das Effluat der perfundierten Leber wurde gesammelt, und die darin enthaltenen Proteine durch Präzipitation entfernt. Anschließend wurden die im Überstand des Leber-effluats verbliebenen, radioaktiv markierten Peptide durch Szintillations-Messungen bestimmt. Hierbei gilt die Veränderung der Menge an ^3H -Leucin als direktes Maß für die Autophagie. In diesem System sind keine absoluten Messungen der autophagischen Aktivität möglich. Daher wurde die Autophagie maximal stimuliert, um unter *steady-state*-Bedingungen die Veränderung der autophagischen Proteolyse durch Perfusion von physiologischen und/oder pharmakologischen Inhibitoren der Autophagie zu analysieren (Schliess & Häussinger, 2003).

Abbildung 37A zeigt, dass die durch Aminosäureentzug induzierte hepatische Autophagie auch in Mäusen reversibel durch Insulin inhibiert werden konnte. Um zunächst die Beteiligung von G_i -Proteinen in diesem Prozess zu prüfen, wurden die Lebern von Wildtyp (Wt)-Mäusen etwa 1,5 Stunden vor Insulingabe rezirkulierend mit Pertussistoxin (PTX) perfundiert. PTX verringerte deutlich die anti-autophagische Wirkung von Insulin (Abbildung 37A). Diese Daten deuten auf eine Rolle von G_i -Proteinen signalabwärts der Insulinrezeptor-Signalkaskade hin. Auch hohe

Konzentrationen von Aminosäuren sind in der Lage eine maximale Inhibierung der Autophagie auszulösen (Meijer & Codogno, 2006). Abbildung 37B zeigt, dass Phenylalanin die hepatische, autophagische Proteolyse in Wildtyp-Mäusen reversibel um etwa 25 % inhibierte. Dieser Effekt ist quantitativ vergleichbar mit der anti-autophagischen Wirkung von Insulin (siehe Abbildung 37A). Auch die Aminosäure-vermittelte Inhibierung der autophagischen Proteolyse war durch PTX inhibierbar (Abbildung 37B). Allerdings zeigten sich Unterschiede in der Kinetik der Inhibition der autophagischen Aktivität durch die gewählten Agonisten: Während die autophagische Proteolyse nach etwa 20 Minuten durch Insulin halbmaximal gehemmt war (Abbildung 37A), inhibierte Phenylalanin die Autophagie bereits nach 5 - 10 min halbmaximal (Abbildung 37B).

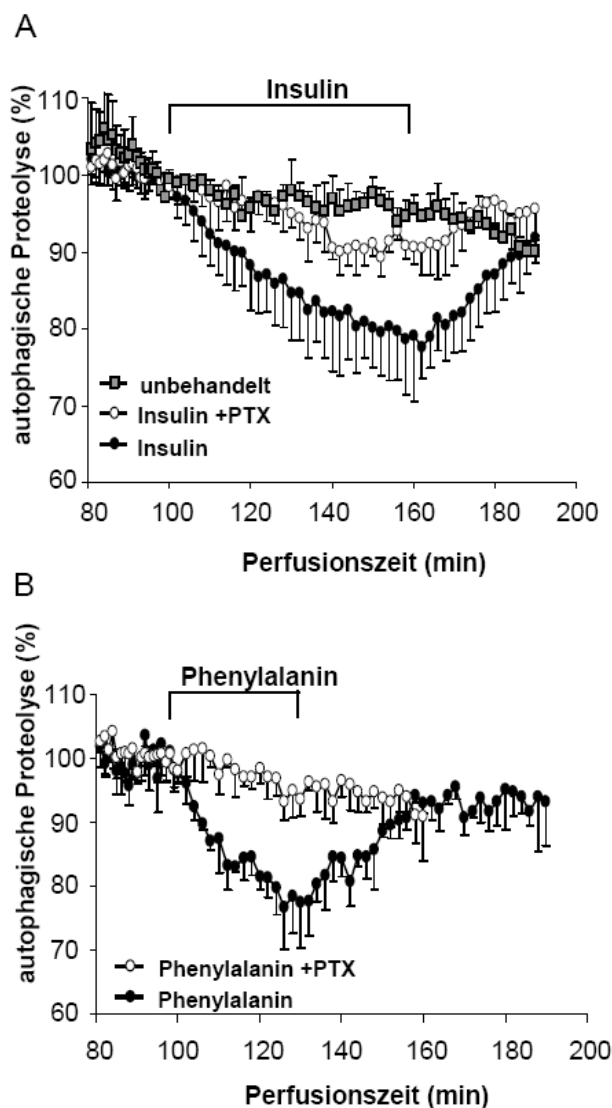


Abbildung 37. G_i-Proteine sind an der Regulierung der autophagischen Proteolyse beteiligt

(A) Die *in-situ*-Leberperfusion von Wildtyp-Mäusen mit Insulin (35 nM für 60 Minuten), aber nicht mit dem Perfusionspuffer allein (unbehandelt), führte zu einer reversiblen Inhibierung der autophagischen Proteolyse. Die Perfusion der Lebern mit PTX (100 ng/ml für 60 Minuten) vor der Perfusion mit Insulin (35 nM für 60 Minuten) inhibierte die Wirkung von Insulin. (B) Die *in-situ*-Leberperfusion mit Phenylalanin (2 mM für 30 Minuten) inhibierte reversibel die autophagische Proteolyse. Eine Vorbehandlung mit PTX (100 ng/ml für 60 Minuten) hemmte den inhibierenden Effekt des Phenylalanins (2 mM für 30 Minuten). Die Kurven repräsentieren Mittelwerte \pm SD von vier Messungen in drei bis vier unabhängigen Experimenten. Die *in-situ*-Leberperfusionsmessungen wurden im Arbeitskreis von Prof. D. Häussinger, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, durchgeführt. Diese Abbildung stammt aus der Publikation (Gohla *et al.*, 2007b).

Mittels Immunoblotting und ADP-Ribosylierung in der Leber konnte gezeigt werden, dass vorwiegend die peripheren G_i -Proteine $G\alpha_{i2}$ und, in deutlich geringerer Konzentration, $G\alpha_{i3}$ exprimiert werden (Abbildung 38A, links, Daten wurden freundlicherweise von Frau Katja Pexa aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt). Die Abwesenheit von $G\alpha_{i2}$ bzw. $G\alpha_{i3}$ in den jeweiligen Gen-defizienten Mäuselebern wurde durch [32 P]ADP-Ribosylierung bestätigt (Abbildung 38A, rechts). Studien an Kolonkarzinom-Zelllinien deuten auf eine Rolle von $G\alpha_{i3}$ in der Regulierung der autophagischen Proteolyse (Petiot *et al.*, 1999). Um die mögliche Rolle von $G\alpha_{i3}$ in der Insulin- und Phenylalanin-medierten Regulierung der Autophagie *in vivo* zu untersuchen und um den potenziellen Beitrag von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ direkt zu vergleichen, wurde die autophagische Proteolyse in perfundierten Lebern von $G\alpha_{i2}$ - und $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen analysiert. Abbildung 38B zeigt, dass die anti-autophagische Wirkung von Insulin in $G\alpha_{i3}$ -defizienten Lebern fast aufgehoben war. Dieser Effekt war quantitativ vergleichbar mit der Wirkung von PTX (Abbildung 37A). Im Gegensatz dazu war die anti-autophagische Wirkung von Insulin in Abwesenheit von $G\alpha_{i2}$, der quantitativ vorherrschenden $G\alpha_i$ -Isoform in Hepatozyten, vergleichbar mit dem Effekt von Insulin in Wildtyp-Mäusen (Abbildung 38B, vgl. mit Abbildung 37). Die spezifische Beteiligung von $G\alpha_{i3}$ an der Inhibition der hepatischen Autophagie war nicht nur nach Perfusion von Insulin, sondern auch nach Stimulation mit Phenylalanin zu beobachten (Abbildung 38C). Zusammengefasst zeigen diese Befunde eine Beteiligung von $G\alpha_{i3}$ bei der Insulin- und Aminosäure-vermittelten Inhibition der hepatischen autophagischen Proteolyse.

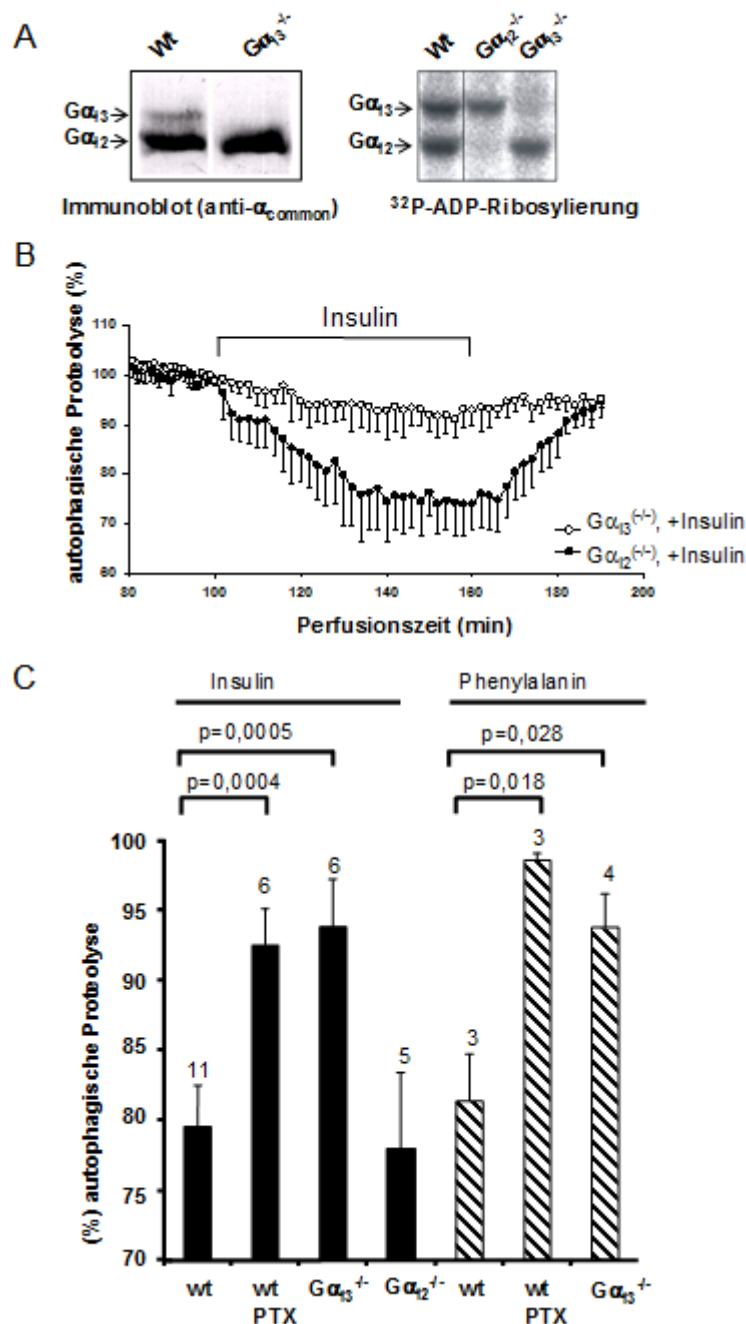


Abbildung 38. $G\alpha_{i3}$ ist essentiell für die Vermittlung der anti-autophagischen Wirkung von Insulin und Phenylalanin

(A) Lebern von $G\alpha_{i2}^{-/-}$ und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -defizienten Mäusen wurden *in situ* mit Insulin (35 nM für 60 Minuten) perfundiert. Links: Immunoblot von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in Lebergewebe. Rechts: Die ^{32}P -ADP-Ribosylierung zeigt das Fehlen von $G\alpha_{i2}$ und $G\alpha_{i3}$ in den jeweiligen gendefizienten Mäusen. Gezeigt sind ein repräsentativer Immunoblot und Autoradiograph, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau Dipl.-Biol. Katja Pexa (n = 3). (B) Die Kurven repräsentieren Mittelwerte \pm SD von Messungen in sechs $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen und fünf $G\alpha_{i2}^{-/-}$ -Mäusen. Die *in-situ*-Leberperfusionsmessungen wurden im Arbeitskreis von Prof. D. Häussinger, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf, durchgeführt. (C) Statistische Auswertung der *in-situ*-Mausleberperfusions-Experimente. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der relativen autophagischen Inhibition \pm SD der angegebenen Anzahl an Wt-, $G\alpha_{i2}^{-/-}$ - und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen, die mit Insulin (35 nM für 60 Minuten; schwarze Balken), Phenylalanin (2 mM für 30 Minuten; schraffierte Balken), und/oder PTX (100 ng/ml für 60 Minuten) behandelt wurden. Ein zweiseitiger Student t-Test wurde zur Ermittlung der statistischen Signifikanz herangezogen. Die Abbildungen stammen aus der Publikation (Gohla *et al.*, 2007b).

9.2 Genotypische Verteilung von Mäusen aus $G\alpha_{i2/i3}$ -Kreuzungen

Tabelle 13: Genotypische Verteilung von Mäusen (C56BL/6) aus $G\alpha_{i3}^{+/+}$ -Kreuzungen

Genetischer Hintergrund	Genotyp	P21 [†]	Erwartete Verteilung nach Mendel
C57BL/6	$G\alpha_{i3}^{+/+}$	26,9 % (111)*	25 %
	$G\alpha_{i3}^{+/-}$	50,5 % (208)*	50 %
	$G\alpha_{i3}^{-/-}$	22,6 % (93)*	25 %

* Anzahl der Tiere. † untersucht wurden insgesamt 412 (203 männliche und 209 weibliche) Mäuse aus 67 Würfen am postnatalen Tag 21 (P21)

Tabelle 14: Genotypische Verteilung von Mäusen (C56BL/6) aus $G\alpha_{i2}^{+/+}$ -Kreuzungen

Genetischer Hintergrund	Genotyp	E14	P21 ^{††}	Erwartete Verteilung nach Mendel
C57BL/6	$G\alpha_{i2}^{+/+}$	15,9 % (7)*	31,4 % (244)*	25 %
	$G\alpha_{i2}^{+/-}$	65,9 % (29)*	58,9 % (458)*	50 %
	$G\alpha_{i2}^{-/-}$	18,2 % (8)*	9,7 % (75)*	25 %

* Anzahl der Tiere

† untersucht wurden insgesamt 44 Föten aus sechs Würfen am Tag E14

†† untersucht wurden insgesamt 777 (399 männliche und 378 weibliche) Mäuse aus 127 Würfen am Tag P21

Tabelle 15: Genotypische Verteilung von Föten und Mäusen aus $G\alpha_{i2}^{+/+}/G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Kreuzungen

Gene- tischer Hinter- grund	Genotyp	E8.5– 9.0†	E9.5– 10.0††	E10.5§	P21¶	Er-wartete Vertei-lung nach Mendel
129Sv/ C57BL/6‡	$G\alpha_{i2}^{+/+}G\alpha_{i3}^{-/-}$	14,7 % (5)*	31,9 % (15)*	25,9 % (14)*	46,3 % (82)*	25 %
	$G\alpha_{i2}^{+/+}G\alpha_{i3}^{-/-}$	76,5 % (26)*	59,6 % (28)*	72,2 % (39)*	53,7 % (95)*	50 %
129Sv/ C57BL/6‡	$G\alpha_{i2}^{-/-}G\alpha_{i3}^{-/-}$	8,8 % (3)*	8,5 % (4)*	1,9 % (1)*	0 % (0)*	25 %

* Anzahl der Tiere

† untersucht wurden insgesamt 34 Föten aus sechs Würfen am Tag E8,5–E9,0.

†† untersucht wurden insgesamt 47 Föten aus zehn Würfen am Tag E9,5–E10,0.

§ untersucht wurden insgesamt 54 Föten aus neun Würfen am Tag E10,5.

¶ untersucht wurden insgesamt 177 Mäuse aus 52 Würfen am Tag P21.

‡ 129Sv/C56BL/6 gemischter genetischer Hintergrund.

9.3 Gewichtskurven der Einzeltiere aus der Langzeitbeobachtung

Tabelle 16: Alter der untersuchten Tiere aus der Langzeitbeobachtung

Alter in Tagen				
Quantile	Wildtyp männlich (n = 11)	Wildtyp weiblich (n = 14)	$G\alpha_{i3}^{-/-}$ männlich (n = 15)	$G\alpha_{i3}^{-/-}$ weiblich (n = 13)
$Q_{.10}$	492	440	564	558
$Q_{.25}$	725	650	714	842
$Q_{.5}$	854	671	786	913
$Q_{.75}$	893	690	907	944
$Q_{.90}$	937	857	944	1005
Mittelwert (± SD)	647 (± 321)	621 (± 283)	770 (± 171)	726 (± 333)

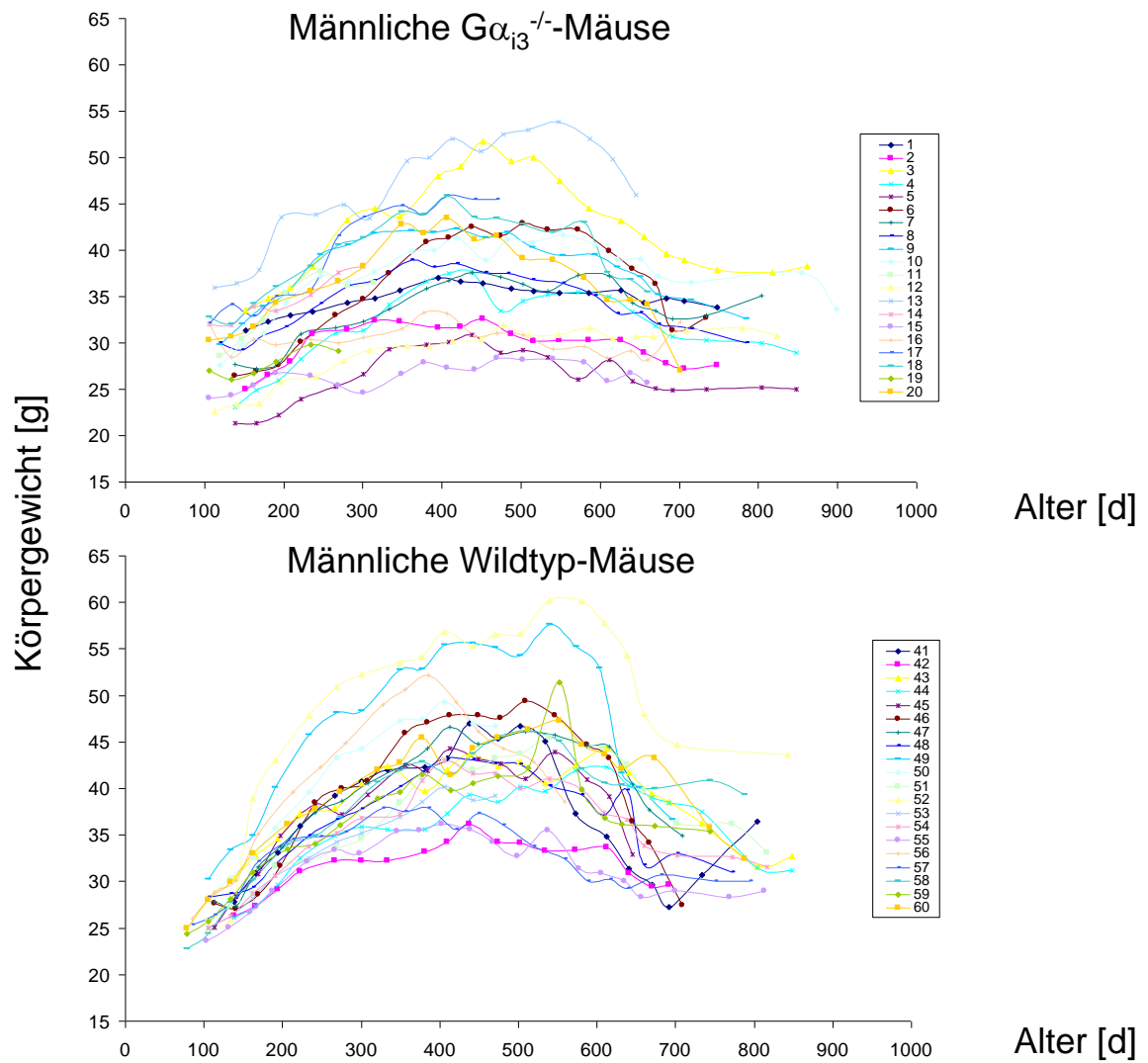


Abbildung 39. Gewichtsverläufe der männlichen Mäuse

Darstellung aller Einzelgewichtsverläufe von jeweils 20 männlichen $G\alpha_{i3}^{-/-}$ - und Wildtyp-Tieren (Nr. 1-20 und 41-60).

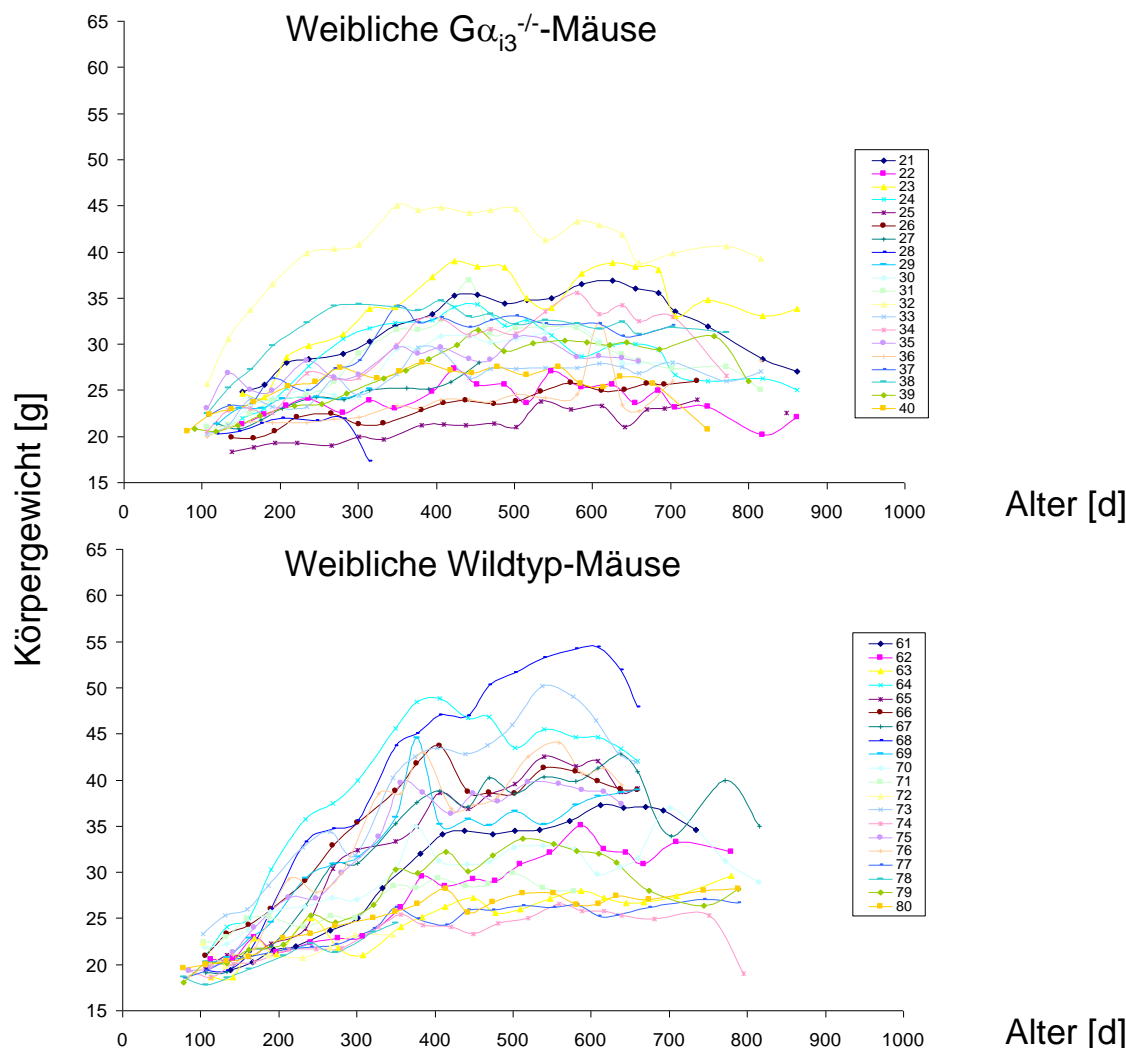


Abbildung 40. Gewichtsverläufe der weiblichen Mäuse

Darstellung aller Einzelgewichtsverläufe von jeweils 20 weiblichen $G\alpha_{i3}^{-/-}$ - und Wildtyp-Tieren (Nr. 21-40 und 61-80).

9.4 Kardiovaskuläre Parameter von $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen

Kardiovaskuläre Parameter von $G\alpha_{i3}$ -defizienten bzw. Wt-Mäusen wurden mit Hilfe von telemetrischen Verfahren von Dr. Roland Piekorz und Katja Pexa in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Ruth, Pharmazeutisches Institut der Universität Tübingen, erfasst. Hierzu wurden der arterielle Blutdruck (MAP; *mean arterial pressure*) und die Herzfrequenz von $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäusen *versus* Wildtyp-Mäusen in Abhängigkeit vom Tag/Nacht-Rhythmus und körperlicher Aktivität der Tiere an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils über 24 Stunden telemetrisch aufgezeichnet. Alle Messungen erfolgten an männlichen Tieren vergleichbaren Alters und Gewichts. Die statistische Auswertung der erhobenen Messwerte erfolgte für die

Ruhephase (9 – 15 Uhr), und für die nachtaktive Phase (17 – 3 Uhr) der Wildtyp- und $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Tiere. Interessanterweise wiesen die $G\alpha_{i3}$ -defizienten Mäuse tagsüber im Ruhezustand (Beobachtungsfenster: 9 – 15 Uhr) gegenüber Kontrolltieren signifikant höhere arterielle Blutdruckwerte sowie eine auffallend erhöhte basale Herzrate auf. Andererseits zeigten $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse während der nachtaktiven Phase (Beobachtungsfenster: 17 – 3 Uhr) einen gegenüber Wildtyp-Kontrolltieren fast um die Hälfte reduzierten Bewegungsindex (*physical activity; arbitrary units (A.U.)*): $6,4 \pm 1,2$; $G\alpha_{i3}^{-/-}$ vs. $11,1 \pm 2,3$; Wt; $p < 0,001$).

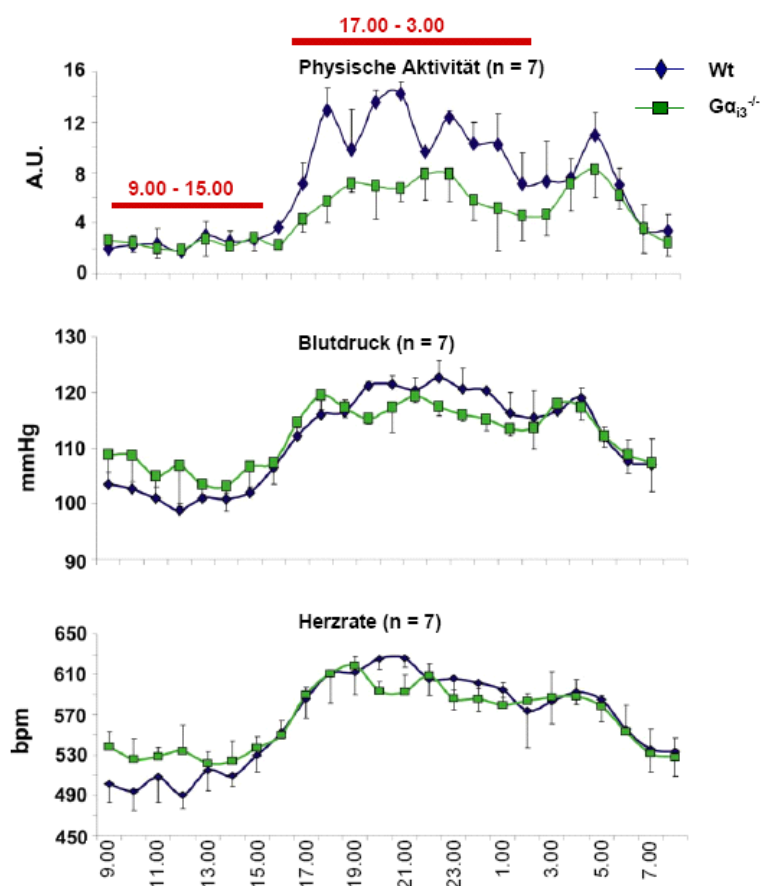


Abbildung 41. $G\alpha_{i3}$ -defiziente Mäuse weisen unterschiedliche kardiovaskuläre Parameter auf

In Abhängigkeit von der physischen Aktivität der Tiere (oben), die den Tag/Nacht-Rhythmus widerspiegelt, wurden Blutdruck (MAP; Mitte) und Herzrate (unten) an drei aufeinander folgenden Tagen jeweils über 24 Stunden telemetrisch gemessen. Statistische Auswertung der gemessenen Parameter während der Ruhephase der Tiere (9 – 15 Uhr) jeweils Wildtyp (Wt) vs. $G\alpha_{i3}^{-/-}$. Mittelwerte \pm SD: Physical activity, $2,5 \pm 0,54$ vs. $2,37 \pm 0,33$ A.U.; $p = 0,6$; MAP (Mittelwert aus systolischem und diastolischem Blutdruck), $102,1 \pm 2,4$ vs. $106,3 \pm 2,1$ mmHg; $p = 0,003$; Herzrate, $510,2 \pm 18,5$ vs. $530 \pm 6,2$ bpm (beats per minute); $p = 0,005$. Blau: Wildtyp-Kontrolltiere; grün: $G\alpha_{i3}$ -defiziente Tiere. Alle Messungen erfolgten an männlichen Tieren vergleichbaren Alters und Gewichts. Die Messungen wurden freundlicherweise von Dr. Roland Piekorz/Katja Pexa; Universität Düsseldorf in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Ruth, Pharmazeutisches Institut der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

9.5 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse aus der Serumanalytik

Tabelle 17: Ergebnisse der klinisch-chemischen Serumanalytik in männlichen Wildtyp-Mäusen (n = 11)

¹ Tier	Alter [d]	ALT (GPT) [U/L]	AP [U/L]	AST (GOT) [U/L]	Bili- rubin gesamt [μmol/L]	Al- bumin [g/L]	Gesamt eiweiß [g/L]	Creatin- kinase [U/L]	Harn- stoff [mmol/L]	Krea- tinin [μmol/L]	Cho- lesterin [mg/dL]	Trigly- ceride [mg/dL]	Glu- cose [mg/dL]	Natrium [mmol/L]	Kalium [mmol/L]	Kalzium [mmol/L]	Phos- phat anorg. [mmol/L]	Chlorid [mmol/L]
50	492	19,8	39	40,7	1,8	37,6	57,4	n.b.	10,0	14,7	108	175	294	155	9,6	2,7	4,2	112
53	475	14,5	34	56,1	1,1	33,9	51,8	n.b.	10,5	17,8	101	175	304	155	9,3	2,5	3,8	114
42	733	20,9	17	32,7	1,3	27,5	44,5	49,9	2,4	n.b.	93	105	243	152	8,5	2,8	3,8	117
49	717	96,0	47	169,6	1,9	29,3	72,2	47,2	19,4	n.b.	50	70	119	161	8,2	3,0	3,1	126
55	854	19,4	96	40,6	2,6	44,9	72,9	n.b.	11,2	18,0	131	61	281	189	10,5	3,2	4,3	147
54	854	21,1	45	43,8	3,0	38,7	60,5	n.b.	9,8	5,2	89	105	186	160	9,6	2,6	3,3	117
52	786	34,5	51	107,9	1,4	36,5	58,3	n.b.	15,2	4,9	108	166	200	157	9,5	2,6	3,9	115
51	854	44,0	55	58,1	2,7	30,9	50,1	n.b.	8,8	2,8	73	61	124	158	9,3	2,6	3,3	117
60	931	28,9	158	40,4	4,0	34,2	60,1	n.b.	11,7	5,6	124	61	200	155	9,1	2,8	3,3	109
43	937	23,3	21	49,6	6,1	27,4	37,5	n.b.	10,2	4,8	58	44	128	162	9,9	2,6	3,3	120
44	937	85,8	48	72,4	6,5	29,9	49,3	n.b.	8,1	16,7	85	53	151	157	9,1	2,7	2,9	115

¹Die untersuchten Tiere aus der Gruppe Wt männlich: Nr. 41 – 60.

ALT = Alanin-Aminotransferase, AP = alkalische Phosphatase, AST = Aspartat-Aminotransferase, n. b. = nicht bestimmt

Tabelle 18: Ergebnisse der klinisch-chemischen Serumanalytik in weiblichen Wildtyp-Mäusen (n = 14)

¹ Tier	Alter [d]	ALT (GPT) [U/L]	AP [U/L]	AST (GOT) [U/L]	Bili- rubin gesamt [µmol/L]	Al- bumin [g/L]	Gesamt eiweiß [g/L]	Creatin- kinase [U/L]	Harn- stoff [mmol/L]	Krea- tinin [µmol/L]	Cho- lesterin [mg/dL]	Trigly- ceride [mg/dL]	Glu- cose [mg/dL]	Natrium [mmol/L]	Kalium [mmol/L]	Kalzium [mmol/L]	Phos- phat anorg. [mmol/L]	Chlorid [mmol/L]
78	371	32,2	16	68,6	1,5	21,0	45,1	n.b.	9,4	3,7	77	289	250	156	8,6	2,4	3,2	116
72	348	275,2	71	542,4	3,3	28,8	54,9	n.b.	5,1	7,4	43	53	168	154	5,8	2,3	2,5	107
68	671	48,4	46	197,9	1,4	36,6	61,7	1202,8	9,8	n.b.	89	105	202	151	8,5	2,8	4,0	112
76	650	28,9	73	90,8	2,3	38,1	58,6	226,9	9,2	n.b.	81	96	223	155	8,5	2,8	3,9	116
64	671	33,5	62	45,9	0,2	35,6	58,4	17,9	7,6	n.b.	85	70	157	166	8,8	2,8	4,1	123
69	671	55,2	46	155,7	0,2	40,2	62,2	224,5	8,3	n.b.	104	114	202	166	7,5	2,8	3,5	119
73	697	51,4	20	174,4	1,1	33,0	54,8	1954,5	8,0	n.b.	81	96	267	150	9,3	2,8	3,8	112
65	671	34,7	77	50,2	0,2	38,2	59,4	58,5	10,6	n.b.	104	131	200	167	8,7	2,8	4,1	124
71	600	36,2	40	287,3	0,7	30,5	45,5	17,5	15,5	n.b.	70	123	169	162	8,5	2,9	3,2	121
66	671	63,9	99	277,0	1,6	34,6	52,5	1865,0	9,2	n.b.	81	96	180	151	8,2	2,6	3,8	116
75	650	18,0	72	36,4	1,1	40,6	61,3	24,2	9,9	n.b.	104	114	238	170	9,0	2,9	4,3	126
80	814	96,9	33	62,4	10,8	31,5	43,6	n.b.	9,6	1,6	70	70	173	188	8,7	2,8	2,8	151
77	876	61,7	53	98,5	6,3	28,6	45,8	n.b.	7,5	7,9	58	44	124	157	8,4	2,7	2,9	122
79	920	52,4	67	209,4	4,1	n.b.	n.b.	n.b.	10,1	3,7	58	53	n.b.	159	10,0	2,7	2,7	116

¹Die untersuchten Tiere aus der Gruppe Wt weiblich: Nr. 61 – 80. ALT = Alanin-Aminotransferase, AP = alkalische Phosphatase, AST = Aspartat-Aminotransferase

Tabelle 19: Ergebnisse der klinisch-chemischen Serumanalytik in männlichen $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen (n = 15)

¹ Tier	Alter [d]	ALT (GPT) [U/L]	AP [U/L]	AST (GOT) [U/L]	Bili- rubin gesamt [μmol/L]	Al- bumin [g/L]	Gesamt eiweiß [g/L]	Creatin- kinase [U/L]	Harn- stoff [mmol/L]	Krea- tinin [μmol/L]	Cho- lesterin [mg/dL]	Trigly- ceride [mg/dL]	Glu- cose [mg/dL]	Natrium [mmol/L]	Kalium [mmol/L]	Kalzium [mmol/L]	Phos- phat anorg. [mmol/L]	Chlorid [mmol/L]
17	492	22,4	18	33,1	2,6	26,5	49,5	n.b.	10,6	8,4	81	88	164	158	8,7	2,6	3,3	113
14	347	237,4	30	398,3	2,3	14,6	34,7	n.b.	11,3	22,2	108	376	90	135	23,6	2,5	7,1	112
2	769	29,4	35	61,4	0,6	29,7	53,8	66,0	10,8	n.b.	108	114	106	154	10,7	2,6	3,7	117
18	671	21,5	39	48,8	n.b.	33,0	n.b.	n.b.	11,8	n.b.	116	114	4	168	8,7	2,8	4,2	116
6	755	26,4	24	67,4	3,8	27,7	43,3	17,8	12,4	n.b.	54	788	135	176	7,0	2,7	2,8	138
20	727	19,0	25	38,2	1,0	27,8	47,0	43,1	12,3	n.b.	77	53	175	154	8,8	2,7	3,5	116
15	701	28,5	40	62,1	1,8	37,3	56,7	247,5	9,9	n.b.	89	88	261	148	8,6	2,8	3,7	108
3	888	22,8	49	28,1	2,2	35,7	53,9	n.b.	15,7	7,6	93	79	200	160	9,9	2,7	2,8	122
7	809	163,9	35	267,0	7,9	24,6	35,8	n.b.	26,3	0,7	43	44	34	199	8,2	2,7	4,3	164
16	786	24,2	49	100,8	2,0	39,2	61,4	n.b.	13,6	17,0	97	140	319	164	10,5	2,8	4,3	120
1	832	21,8	58	35,3	2,5	38,0	57,9	n.b.	9,3	7,8	89	70	220	168	9,7	2,7	3,7	121
4	944	14,6	56	45,3	2,4	34,0	57,5	n.b.	11,3	7,5	104	53	150	159	9,4	2,8	3,7	113
5	944	88,9	53	88,3	5,9	29,2	44,8	n.b.	9,7	4,6	77	44	166	156	9,8	2,7	3,3	116
10	926	31,5	70	36,8	3,6	36,9	58,8	n.b.	13,2	16,8	124	70	202	156	8,8	2,9	3,5	111

¹ Tier	Alter [d]	ALT (GPT) [U/L]	AP [U/L]	AST (GOT) [U/L]	Bili- rubin gesamt [μmol/L]	Al- bumin [g/L]	Gesamt eiweiß [g/L]	Creatin- kinase [U/L]	Harn- stoff [mmol/L]	Krea- tinin [μmol/L]	Cho- lesterin [mg/dL]	Trigly- ceride [mg/dL]	Glu- cose [mg/dL]	Natrium [mmol/L]	Kalium [mmol/L]	Kalzium [mmol/L]	Phos- phat anorg. [mmol/L]	Chlorid [mmol/L]
12	955	56,9	50	61,7	2,9	34,6	55,1	n.b.	10,8	16,0	66	96	252	153	10,0	2,9	3,5	109

¹Die untersuchten Tiere aus der Gruppe $G\alpha_{i3}^{-/-}$ männlich: Nr. 1 – 20

ALT = Alanin-Aminotransferase, AP = alkalische Phosphatase, AST = Aspartat-Aminotransferase, n. b. = nicht bestimmt

Tabelle 20: Ergebnisse der klinisch-chemischen Serumanalytik in weiblichen $G\alpha_{i3}^{-/-}$ -Mäusen (n = 13)

¹ Tier	Alter [d]	ALT (GPT) [U/L]	AP [U/L]	AST (GOT) [U/L]	Bili- rubin gesamt [μmol/L]	Al- bumin [g/L]	Gesamt eiweiß [g/L]	Creatin- kinase [U/L]	Harn- stoff [mmol/L]	Krea- tinin [μmol/L]	Cho- lesterin [mg/dL]	Trigly- ceride [mg/dL]	Glu- cose [mg/dL]	Natrium [mmol/L]	Kalium [mmol/L]	Kalzium [mmol/L]	Phos- phat anorg. [mmol/L]	Chlorid [mmol/L]
29	349	29,5	55	190,8	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
27	489	170,6	28	244,7	12,3	19,2	27,7	n.b.	12,1	<1,0	50	26	88	174	10,3	2,4	3,2	137
30	842	10,5	42	42,8	2,2	34,9	65,4	n.b.	7,8	15,8	70	53	225	178	9	3,2	3,2	141
34	832	16,2	19	46,1	0,9	33,7	54,4	n.b.	7,7	7,8	70	158	148	161	9,1	2,7	3,6	125
26	944	63,2	35	148,1	5,0	30,3	47,9	n.b.	8,8	7,0	54	201	245	153	10,4	2,7	3,8	115
31	913	33,2	76	93,8	3,2	34,3	51,5	n.b.	8,8	13,5	70	53	220	153	9	2,6	3,1	113
32	913	27,2	58	46,8	3,4	37,6	56,2	n.b.	8,0	10,8	81	70	214	153	9,5	2,7	2,9	116

¹ Tier	Alter [d]	ALT (GPT) [U/L]	AP [U/L]	AST (GOT) [U/L]	Bili- rubin gesamt [μmol/L]	Al- bumin [g/L]	Gesamt eiweiß [g/L]	Creatin- kinase [U/L]	Harn- stoff [mmol/L]	Krea- tinin [μmol/L]	Cho- lesterin [mg/dL]	Trigly- ceride [mg/dL]	Glu- cose [mg/dL]	Natrium [mmol/L]	Kalium [mmol/L]	Kalzium [mmol/L]	Phos- phat anorg. [mmol/L]	Chlorid [mmol/L]
21	1005	42,0	57	226,6	5,3	23,2	39,3	n.b.	18,7	3,1	73	70	41	177	9,4	2,6	3,4	136
22	1005	42,4	24	88,4	3,2	39,3	78,7	n.b.	11,4	21,4	104	44	130	159	8,2	2,8	3,1	118
23	1005	20,5	28	43,6	2,5	30,8	55,2	n.b.	10,6	14,6	62	44	148	153	8,7	2,5	2,6	116
39	932	38,2	45	205,5	6,9	33,9	53,7	n.b.	11,7	10,4	62	35	196	157	8,9	2,6	3,0	114
25	936	115,5	70	275,7	4,4	31,9	46,7	n.b.	9,1	8,6	54	44	270	158	11,2	2,7	3,9	116
36	904	26,8	43	75,5	4,6	31,6	53,9	n.b.	7,0	7,5	50	44	204	154	7,8	2,6	3,1	116

¹Die untersuchten Tiere aus der Gruppe Gα₁₃^(-/-) weiblich: Nr. 21 – 40

ALT = Alanin-Aminotransferase, AP = alkalische Phosphatase, AST = Aspartat-Aminotransferase, n. b. = nicht bestimmt

10 EIGENE PUBLIKATIONEN

Originalarbeiten

Antje Gohla, Karinna Klement, Roland P. Piekorz, Katja Pexa, Stephan vom Dahl, Karsten Spicher, Vladyslav Dreval, Dieter Häussinger, Lutz Birnbaumer, Bernd Nürnberg. An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein G_{i3} in the anti-autophagic action of insulin in the liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2007 Feb 20;104(8):3003-8

Antje Gohla, Karinna Klement, Bernd Nürnberg. The Heterotrimeric G Protein G(i3) Regulates Hepatic Autophagy Downstream of the Insulin Receptor. *Autophagy* 2007 Jul-Aug;3(4):393-5

Kongressbeiträge

Helga Mölleken, Karinna Klement, Stefan Adelt, Günther Vogel. Inositolphosphates in Various Leaves and Plant Cell Cultures and during Plasmolysis. Tagungsband der Botanikertagung 2002, Freiburg (Breisgau), 22. – 27. September 2002 (Poster)

Karinna Klement, Antje Gohla, Stephan vom Dahl, Katja Pexa, Frank Dombrowski, Roland P. Piekorz, Bernd Nürnberg. Insulin-induced regulation of autophagy by G α_{i3} . 26. Blankenese Konferenz, Hamburg, 20. – 24. Mai 2006 (Poster)

Karinna Klement, Antje Gohla, Roland P. Piekorz, Katja Pexa, Stephan vom Dahl, Karsten Spicher, Vladyslav Dreval, Dieter Häussinger, Lutz Birnbaumer, Bernd Nürnberg. An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein G_{i3} in the anti-autophagic action of insulin in the liver. Keystone Symposia: Autophagy in Health and Disease, Monterey, USA, 15. – 20. April 2007 (Poster)

Karinna Klement, Antje Gohla, Roland P. Piekorz, Katja Pexa, Stephan vom Dahl, Karsten Spicher, Vladyslav Dreval, Dieter Häussinger, Lutz Birnbaumer, Bernd Nürnberg. An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein G_{i3} in the anti-autophagic action of insulin in the liver. Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses, Universität Düsseldorf, 22. – 23. Juni 2007 (Poster)

Karinna Klement, Ana Novakovic, Anette Schürmann, Roland P. Piekorz, Lutz Birnbaumer, Hans-Georg Joost, Dieter Häussinger, Antje Gohla, Bernd Nürnberg. An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein G_{i3} in the anti-autophagic action of insulin in the liver. 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz, 11. - 13. März 2008 (Vortrag)

11 *LEBENS LAUF*

Persönliche Daten

Name:	Karina Marie Thiele, geb. Klement
Geburtsdatum/-ort:	10.12.1979 in Freiburg im Breisgau
Staatsangehörigkeit:	deutsch und US-amerikanisch
Familienstand:	verheiratet, 1 Kind

Schulbildung

1986 – 1992	Grund- und Teilhauptschule in Kochel am See
1992 – 1996	Mädchenrealschule St. Immaculata in Schlehdorf Abschluss: Mittlere Reife
1996 – 1998	Staatliche Fachoberschule in Bad Tölz Abschluss: Fachgebundene Hochschulreife
1998 – 2000	Im Rahmen des Grundstudiums erworbene allgemeine Hochschulreife an der Bergischen Universität Wuppertal

Hochschulstudium und berufliche Tätigkeit

09/1998 – 07/2002	Studium der Lebensmittelchemie an der Bergischen Universität Wuppertal
November 2002	1. Staatsexamen der Lebensmittelchemie
Juli 2004	2. Staatsexamen der Lebensmittelchemie
September 2004	Anerkennung zur staatlich geprüften Lebensmittelchemikerin
03/2005 – 12/2008	Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Universitätsklinikum Düsseldorf Titel der Promotionsarbeit: Charakterisierung $G\alpha_{i3}$ -gendefizienter Mauslinien

01/2009 – 12/2009 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Tübingen

seit 05/2010 Expert Scientific & Regulatory Affairs
i.DRAS GmbH, Martinsried/Planegg

Praktika

07/2001 – 08/2001 Praktikantin, Morphochem AG, München

01/2003 – 06/2003 Werkstudentin, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg

08/2003 – 07/2004 Amtspraktikum für Lebensmittelchemiker, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleissheim und Zentrales Institut des Sanitätsdienstes der Bundeswehr München, Garching-Hochbrück

11/2004 – 02/2005 Praktikantin, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg

12 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich herzlichst all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Professor Dr. Dr. Bernd Nürnberg für die Betreuung der Arbeit und das stete Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Professor Dr. Armin Buschauer für die Bereitschaft meine Arbeit zu begutachten und die vorliegende Arbeit an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität Regensburg zu vertreten.

Frau Professorin Dr. Antje Gohla für die kompetente Betreuung meiner Arbeit, die unzähligen Diskussionen und Anregungen, ohne die diese Arbeit so nie zustande gekommen wäre.

Herrn Dr. Roland Piekorz für die Ratschläge bezüglich der Mausgenetik, sowie für die Organisation der Mausezucht und –studie. Frau Olga Felda für die Mitarbeit und Hilfe bei der Durchführung der arbeitsintensiven Langzeitstudie.

Bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Institutes „Biochemie und Molekularbiologie II“ des Universitätsklinikums Düsseldorf sowie den Mitarbeitern der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, besonders bei Frau Dr. med. vet. Bärbel Peter, möchte ich mich für die Hilfsbereitschaft, Freundlichkeit und gute Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Markus Mroz, ehemals Mitarbeiter im Institut „Experimentelle Hepatologie“, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, danke ich für das Beibringen der murinen Hepatozytenisolierung und -kultivierung.

Meinen Eltern, Kathleen und Werner Klement, möchte ich besonders herzlich dafür danken, dass sie uns Kindern die Möglichkeit und Freiheit gaben, unseren eigenen Weg zu gehen. Und zu guter Letzt meinem Mann Roland, dass er meine „Auf’s“ und „Ab’s“ mitgemacht hat und es vermochte mich immer wieder zu motivieren.